

ARIANI CAVAZZANI SZKUDLAREK

**EFEITOS DO HIPERTIREOIDISMO NO DESEMPENHO DO MÚSCULO
CARDÍACO, NA PRESSÃO ARTERIAL E NA CONCENTRAÇÃO DE
CORTICOSTERONA FECAL DE RATOS**

Curitiba

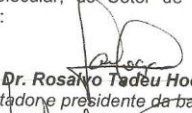
Novembro de 2011

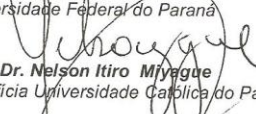
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

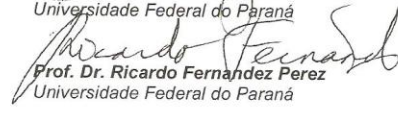
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Rosário Tadeu Hochmuller Fogaça
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Nelson Itiro Miyague
Pontifícia Universidade Católica do Paraná


Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dra. Anita Nishiyama
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez
Universidade Federal do Paraná

E tendo como suplentes,

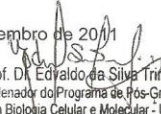
Profa. Dra. Anete Curte Ferraz
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire
Universidade Federal do Paraná

Após argüir a doutoranda **Ariani Cavazzani Szhudlarek**, em relação ao seu trabalho intitulado: **"Avaliação de parâmetros fisiológicos cardiovasculares e do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal em modelo experimental de hipertireoidismo"** são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de DOUTOR em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 01 de novembro de 2011


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR

CENTRO POLITÉCNICO – CEP 81.531-990-JARDIM DAS AMÉRICAS-Caixa Postal 19063-5
FONE: (41) 3361-1676 FAX 3266-2042 – E-Mail- pgbiocel@ufpr.br – www.pgbiocel.ufpr.br CURITIBA-PR

Para meu Mestre Rosalvo T. H. Fogaça.

AGRADECIMENTOS

A

Meus queridos pais, Erenice M. C. Szkudlarek e Ariadne A. Szkudlarek, pelo apoio total e amor incondicional.

Fabíola V. dos Santos, pelo amor e companheirismo em todas as etapas da realização deste trabalho e sua família pelo incentivo e crença na ciência.

Meu irmão Denilson A. C. Szkudlarek, minha amiga e cunhada Carla Szkudlarek, meus sobrinhos, belezuras da minha vida, Ana Letícia, Ana Luísa e Denilson, por fazerem parte de minha história.

Meus amigos Márcio A. da Silva, Fabiano, Helton E. Ramos e Lucianara Nehls por alegrarem tanto a minha vida, tornando - a leve.

Meu amigo Bruno Aldenucci por compartilhar tantos finais de semana dentro do laboratório realizando experimentos, Nelson I. Miyague, pela realização das ecocardiografias e Júlio por auxiliar nas ecocardiografias.

Meu Mestre e amigo Rosalvo T. H. Fogaça e sua esposa e minha amiga e professora Ilana Kassouf, ambos tão importantes em minha aprendizagem profissional e pessoal durante todos estes 12 anos de convivência e apoio desde a especialização em fisiologia.

Meus professores do departamento de fisiologia da UFPR que me guiaram com seus ensinamentos e fizeram parte de minha formação: Anete, Ricardo , Luis Claudio, Rosana, Damiani e Ana Carolina.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	01
1.1 A tireoide	01
1.2 Organificação do iodo.....	02
1.3 Síntese e transporte dos hormônios tireoidianos.....	03
1.4 Ações gerais dos hormônios tireoideos e o hipertireoidismo.....	06
1.4.1 Os receptores dos hormônios tireoideos.....	06
1.4.2 Efeitos fisiológicos dos HT.....	08
1.5 Fisiologia da contração muscular cardíaca.....	09
1.5.1 Acoplamento excitação – contração (AEC) no músculo cardíaco.....	09
1.5.2 Estruturas envolvidas no processo de AEC cardíaco	12
1.5.2.1 Sarcolema e Túbulos Transversos	12
1.5.2.2 Retículo Sarcoplasmático (RS).....	14
1.5.2.3 Mitocôndrias	16
1.5.2.4 Miofilamentos.....	16
1.5.3 Participação do cálcio na fisiologia do músculo cardíaco	18
1.5.4 Bombas de cálcio do RS (SERCA2) e fosfolambano (FL)	20
1.5.5 Relaxamento da célula muscular cardíaca.....	23
1.6 Ciclo Cardíaco.....	24
1.7 Potenciais de Ação Cardíacos.....	26
1.8 Ações dos HT sobre o sistema cardiovascular e o hipertireoidismo.....	29
1.9 Eixo hipotálamo - hipófise - supra – renal.....	34
1.9.1 Associação entre a atividade dos HT e a atividade da glândula supra – renal.....	36

2. JUSTIFICATIVA	41
3.OBJETIVOS	43
3.1 Geral	43
3.2 Específicos.....	43
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 Avaliação da função cardíaca através da ecocardiografia	44
4.2 Avaliação da atividade elétrica do coração mediante eletrocardiografia	47
4.3 Pressão arterial, relação peso do coração/peso corporal, relação peso da glândula supra – renal/peso corporal e mensurações contráteis através da utilização de músculos papilares.....	48
4.4 Avaliação da influência do hipertireoidismo no eixo hipotálamo – hipófise – glândula supra – renal.....	51
4.5 Análise estatística.....	51
5.RESULTADOS	52
5.1 Níveis hormonais basais.....	52
5.2 Influências do hipertireoidismo no eixo hipotálamo – hipófise - supra-renal	52
5.3 Ecocardiografia.....	54
5.4 Avaliação da atividade elétrica do coração mediante eletrocardiografia.....	55
5.5 Pressão arterial, peso do coração / peso corporal, peso da supra-renal / peso corporal e medidas de contração de músculo papilar	58
6 DISCUSSÃO.....	67
7 CONCLUSÃO.....	76
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: GLÂNDULA TIREOIDE HUMANA.....	01
FIGURA. 2: CÉLULAS EPITELIAIS FOLICULARES DA TIREOIDE.....	02
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DA RETROALIMENTAÇÃO NEGATIVA DOS HT SOBRE A HIPÓFISE ANTERIOR.....	04
FIGURA 4: ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO CONTRAÇÃO NO MÚSCULO CARDÍACO	11
FIGURA 5: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS TÚBULOS T E RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO E MIOFILAMENTOS EM MÚSCULO ESTRIADO CARDÍACO DE MAMÍFEROS.	14
FIGURA 6: DISTRIBUIÇÃO DOS MIOFILAMENTOS NO MÚSCULO ESTRIADO CARDÍACO.....	18
FIGURA 7: REGISTRO ECOCARDIOGRÁFICO REALIZADO EM ANIMAL DO GRUPO CONTROLE.....	25
FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO DOS DOIS TIPOS PRINCIPAIS DE POTENCIAIS DE AÇÃO CARDÍACOS, O DE RESPOSTA RÁPIDA (FAST TYPE) E O DE RESPOSTA LENTA (SLOW TYPE).....	28
FIGURA 9: REGISTRO ECOCARDIOGRÁFICO REALIZADO EM ANIMAL DO GRUPO CONTROLE MOSTRANDO OS LOCAIS DELIMITADOS PARA O CÁLCULO DO ÍNDICE DE TEL.....	45
FIGURA 10 REGISTRO ELETROCARDIOGRÁFICO REALIZADO ANIMAL DO GRUPO CONTROLE.....	53
FIGURA 11: REGISTRO ELETROCARDIOGRÁFICO REALIZADO EM ANIMAL DO GRUPO HIPERTIREOIDEO.....	54
FIGURA 12: REGISTRO ORIGINAL DE UM EXPERIMENTO TÍPICO OBTIDO COM PAPILAR ISOLADO ELETRICAMENTE ESTIMULADO.....	56
FIGURA 13: REGISTRO ORIGINAL DE PPP DE 1 SEG. EM PAPILAR ISOLADO ELETRICAMENTE ESTIMULADO DO GC.....	56
FIGURA 14: REGISTRO ORIGINAL DE PPP DE 3 SEG EM PAPILAR ISOLADO ELETRICAMENTE ESTIMULADO DO GC.....	56
FIGURA 15: REGISTRO ORIGINAL DE PPP DE 5 SEG EM PAPILAR ISOLADO ELETRICAMENTE ESTIMULADO DO GC.....	57

FIGURA 16: REGISTRO ORIGINAL DE PPP DE 10 SEG EM PAPILAR ISOLADO ELETRICAMENTE ESTIMULADO DO GC.....	57
---	----

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

TABELA 1: CORTICOSTERONA FECAL DE ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E GRUPO HIPERTIREOIDEO.....	51
TABELAS 2 E 3: VALORES DE RENDIMENTO CARDÍACO DE ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E HIPERTIREOIDEO OBTIDOS ATRAVÉS DE ECOCARDIOGRAFIA...	52
GRÁFICO 1: POTENCIAÇÃO PÓS – PAUSA DE MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS DE ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E HIPERTIREOIDEO. $[Ca^{2+}]_e = 0,5 \text{ mM}$	58
GRÁFICO 2: POTENCIAÇÃO PÓS – PAUSA DE MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS DE ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E HIPERTIREOIDEO. $[Ca^{2+}]_e = 1 \text{ mM}$	58
GRÁFICO 3: POTENCIAÇÃO PÓS – PAUSA DE MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS DE ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E HIPERTIREOIDEO. $[Ca^{2+}]_e = 2 \text{ mM}$	59
GRÁFICO 4: POTENCIAÇÃO PÓS – PAUSA DE MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS DE ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E HIPERTIREOIDEO. $[Ca^{2+}]_e = 3 \text{ mM}$	59
GRÁFICO 5: POTENCIAÇÃO PÓS – PAUSA DE MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS DE ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E HIPERTIREOIDEO. $[Ca^{2+}]_e = 5 \text{ mM}$	60
GRÁFICO 6: POTENCIAÇÃO PÓS – PAUSA DE MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS DE ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E HIPERTIREOIDEO. $[Ca^{2+}]_e = 10 \text{ mM}$	60
GRÁFICO 7: FORÇA DE CONTRAÇÃO MÁXIMA (mN/mm^2) DE ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E HIPERTIREOIDEO.....	61
GRÁFICO 8: CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO $[Ca^{2+}]$ EXTRACELULAR NECESSÁRIA PARA PRODUZIR 50% DA FORÇA MÁXIMA ($F_{MÁX.}$) EM MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS DO GRUPO CONTROLE E HIPERTIREOIDEO.....	61
GRÁFICO 9: VELOCIDADE MÁXIMA DE DESENVOLVIMENTO DE FORÇA DURANTE A CONTRAÇÃO (DF / DT_{MAX}) EM MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS DO GRUPO CONTROLE E HIPERTIREOIDEO.....	62
GRÁFICO 10: VELOCIDADE MÁXIMA DE DIMINUIÇÃO DE FORÇA DURANTE O RELAXAMENTO (DF / DT_{MIN}) EM MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS DO GRUPO CONTROLE E HIPERTIREOIDEO.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

+df/dt - Primeira derivada da produção de força no tempo
-df/dt - Primeira derivada de decréscimo de força no tempo
ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico
AEC – Acoplamento excitação - contração
AMPc - Monofosfato cíclico de adenosina
ATP - Adenosina trifosfato
ADP - Adenosina difosfato
CF – Corticosterona fecal
DC - Débito cardíaco
DHPR – Receptores dihidropiridínicos
DS - Débito sistólico
ERT – Elementos responsivos tireoideos
FC - Frequência cardíaca
FE - Fração de ejeção
FL – Fosfolambano
GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina
GC – Grupo controle
GH – Grupo hipertireoideo
HT – Hormônios tireoideos
Hy – Hipertireoisimo
LBD – Lipoproteína de baixa densidade
LDL – Low density lipoprotein
LEC – Líquido extracelular
MPI – Músculo papilar isolado
PA – Potenciais de ação
PAD – Pressão arterial diastólica
PALT – Pré – albumina ligante de tiroxina
PAM – Pressão arterial média
PAS – Pressão arterial sistólica
PKA - Proteína quinase A
PKC - Proteína quinase C
PPP - Potenciação pós-pausa

RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro
RSJ - Retículo Sarcoplasmático Juncional
RSL - Retículo Sarcoplasmático Longitudinal
RT – Receptores tireoideos
RVPT - Resistência vascular periférica total
RyR - Receptor de rianodina
SE – Erro padrão
SERCA2 - Bomba de Ca^{2+} do RS
RS - Retículo sarcoplasmático
T3 – Triiodotironina
T3_r: Triiodotironina reverso
T4 - Tiroxina
TBG - Globulina ligadora de tiroxina
TBPA - Pré-albumina ligadora da tiroxina
TDOE – Tempo de desaceleração da onda E
TDT - Tempo diastólico total
TE – Tempo de ejeção
TnC - Troponina C
TnI - Troponina I
TnT - Troponina T
TREs - Elementos responsivos aos hormônios tireoidianos
TRH - Hormônio liberador da tireotrofina
TRIV - Tempo de relaxamento isovolumétrico
TSH - Hormônio estimulante da tireóide
VA – Variável A
VDF – Volume diastólico final
VSF – Volume sistólico final

RESUMO

Introdução: Os hormônios tireoideanos (HT) exercem uma ampla gama de influências no sistema cardiovascular. Os genes relacionados com o acoplamento excitação - contração (AEC) do coração são os principais alvos para TH, resultando em efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos. No hipertireoidismo (Hy) tem sido mostrado um aumento no desempenho cardíaco, seguido a longo prazo, por uma diminuição na eficiência cardíaca, além de uma alteração na resistência vascular periférica (RVPT). No entanto, poucos estudos fisiológicos têm sido realizados em modelo animal para investigar as consequências da Hy no coração, pressão arterial e secreção de corticosterona. **Objetivo:** Avaliar o desempenho cardíaco "in vivo" e "in vitro" e os níveis de corticosterona fecais usando um modelo animal de Hy. **Métodos e materiais:** Indução de Hy em ratos Wistar foi feita através de injeções *i.p.* de T3 (200µg/kg) durante 10 dias (grupo hipertireoideo - GH) ou veículo (grupo controle - GC). Após as injeções, o desempenho cardíaco foi avaliado por: ecocardiografia (5500 Sonos, HP) com S12 (5-12 MHz) e 15L6 (7 - 15 MHz); medição direta da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) por meio de canulação da artéria carótida esquerda (WPI - World instrumento de precisão, Inc., modelo BLPR); peso do coração / peso corporal (mg / gr); peso da glândula supra – renal / peso corporal (mg / gr); concentração de corticosterona fecal (CF) e contratilidade músculos papilares isolados (MPI). **Resultados:** Em HG, o ecocardiograma mostrou redução do volume sistólico final (VSF), volume diastólico final (VDF), tempo de ejeção (TE), Tempo diastólico total (TDT), Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), Área diastólica (Diast. área), área sistólica (Syst. área), variável A e relação E/A ($p < 0,05$); frequência cardíaca (FC), fração de ejeção (FE) e débito cardíaco (DC) foram aumentados ($p < 0,05$). Não houve alteração entre os grupos no tempo de contração isovolumétrica (TICV), débito sistólico (DS), índice de Tei e tempo de desaceleração da onda E ($p \geq 0,05$). Níveis de pressão arterial sistólica foram maiores no GH ($p \leq 0,05$). A relação Peso do coração / peso corporal (mg / g) foi maior no GH ($p \leq 0,05$) e não houve diferença estatística na relação peso supra-renal / peso corporal (mg / g). A concentração de CF foi diferente apenas no quinto dia de tratamento. No MPI não houve diferenças estatisticamente significativas na força de contração (mN/mm²) e potenciação pós pausa (1, 3, 5, 10 e 20 segundos) em qualquer uma das concentrações de cálcio extracelular utilizadas ($p \geq 0,05$). Contudo, relação concentração extracelular de cálcio versus força foi maior no GH. A velocidade máxima de desenvolvimento da força durante a contração (dF / dt_{max}) foi maior apenas no 2 mM de cálcio extracelular ($p \leq 0,05$). No entanto, a velocidade máxima de diminuição da força durante o relaxamento (dF / dt_{min}) foi maior em todas as concentrações de cálcio extracelular, exceto em 10 mM ($p \leq 0,05$). **Conclusão:** o Hy aumenta o DC devido a um aumento da frequência cardíaca, aumenta a contratilidade como mostrado pela redução do VDF, VSF, TRIV, TE e TDT, aumento da FE, bem como a maior sensibilidade ao cálcio extracelular e PAS e acelera o relaxamento como mostrado pela maior dF / dt_{min} do MPI e a redução do TRIV e TDT, bem como não afeta a concentração de corticosterona fecal.

Palavras – chave: hipertireoidismo, coração, supra – renal, corticosterona fecal.

ABSTRACT

Introduction: Thyroid hormones (TH) exert a broad range of influences in the cardiovascular system. The genes related to excitation contraction – coupling (ECC) of the heart are the main targets for TH, resulting in inotropic and lusitropic positive effects. In the hyperthyroidism (Hy) has been showed an increase in the cardiac performance, followed in a long term, by a decrease in the cardiac efficiency, besides an alteration in the peripheral vascular resistance (PVR). However, few physiological studies have been performed in animal model to investigate the consequences of Hy in the heart, arterial blood pressures and corticosterone secretion. **Objective:** Evaluate the cardiac performance “in vivo” and “in vitro” and supra-renal activity using an animal model of Hy. **Materials e Methods:** Induction of Hy in Wistar rats was made through *i.p.* injections of T3 (200µg/kg) daily for 10 days (hyperthyroid group - HG) or vehicle (control group - CG). After the injections, cardiac performance was evaluated by: echocardiography (5500 Sonos, HP) with S12 (5 – 12 MHz) and 15L6 (7 – 15 MHz); direct measurement of systolic and diastolic blood pressure through cannulation of left carotid artery (WPI-World Precision Instrument, Inc., model BLPR); heart weight/body weight (mg/gr); supra – renal weight/body weight (mg/gr); fecal corticosterone (FC) concentration and contractility of isolated papillary muscles (IPM). **Results:** In HG, the echocardiography showed reduction of the End Systolic Volume (ESV), End Diastolic Volume (EDV), Ejection Time (ET), Total Diastolic Time (TDT), Isovolumic Relaxation Time (IRT), Diastolic Area (Diast. area), Systolic area (Syst. area), A variable and E/A ratio ($p < 0.05$); Heart Rate (HR), Ejection Fraction (EF) and Cardiac Output (CO) were increased ($p < 0.05$). There was no alteration between groups in the Isovolumic Contraction Time (ICT), Systolic Output (SO), Tei index and deceleration time of E wave ($p \geq 0.05$). Systolic blood pressure levels were higher in the HG ($p \leq 0.05$). Heart weight/body weight (mg/gr) relationship was higher in the HG ($p \leq 0.05$) with no statistically significant difference in the supra–renal weight/body weight (mg/gr). FC concentration was different only on the fifth day of treatment. In IPM there were no statistically significant differences in the twitch force (mN/mm^2) and pos extra systolic potentiation (1, 3, 5, 10 and 20 seconds) in any of the extracellular calcium concentrations used ($p \geq 0,05$). However, force versus extracellular calcium concentration relationship was higher in the HG. The maximum rate of force development during contraction (dF/dt_{max}) was higher only at 2 mM of extracellular calcium ($p \leq 0.05$). However, the maximum rate of force decay during relaxation (dF/dt_{min}) was higher in all extracellular calcium concentrations, except at 10 mM ($p \leq 0.05$). **Conclusion:** Hy increases the CO due to an increase in the HR, increases contractility as showed by the reduction in the EDV, ESV, IRT, ET and TDT, the increased EF as well as the higher sensitivity to extracellular calcium and SBP and accelerates relaxation as showed by the higher dF/dt_{min} of IPM and IRT and TDT reductions as well as does not affect the supra-renal corticosterone excretion.

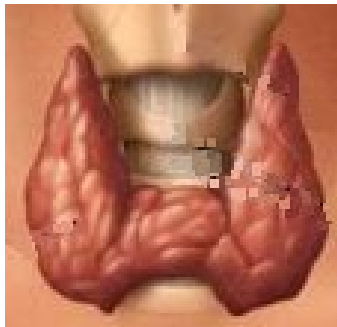
Key – words: hyperthyroidism, heart, supra – renal, fecal corticosterone.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Tireoide

A tireoide é uma glândula situada na parte anterior do pescoço como representado na figura 1 (GREENSPAN, F. S AND STREWLER, 2003). Esta glândula é o maior órgão especializado para a função endócrina no corpo humano (NIAZI AK *et al*, 2011).

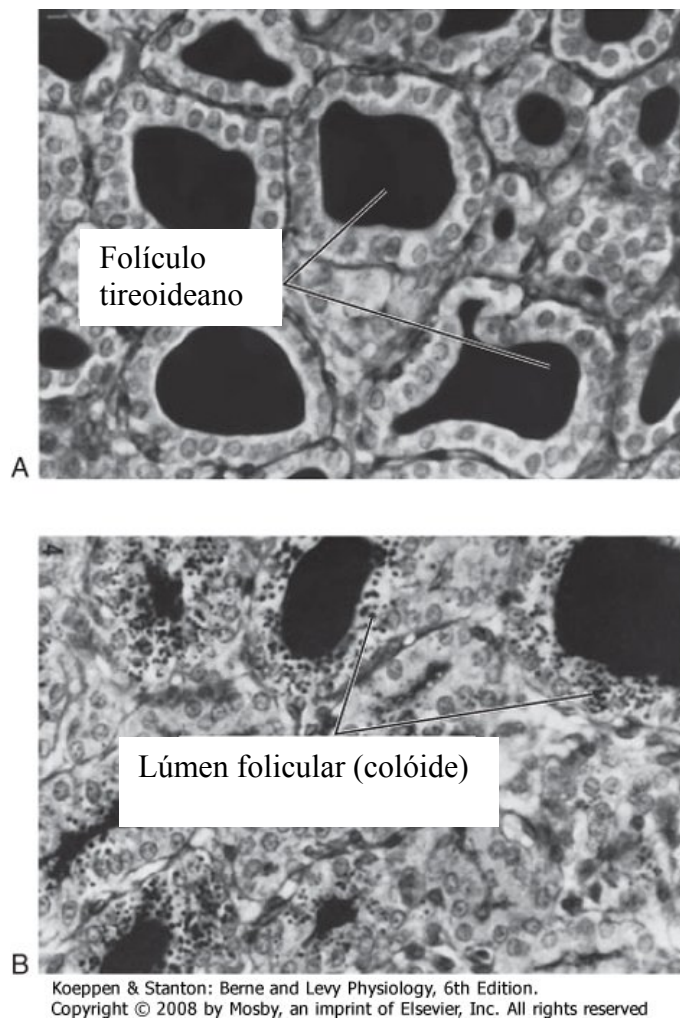
Fig. 1: Glândula tireoide humana.



Fonte: Instituto Arqueiro.

Ao exame microscópico, a glândula tireoide consiste em uma série de folículos de diferentes tamanhos. Os folículos contêm material gelatinoso denominado colóide que está envolto por uma única camada de células epiteliais, como mostradas na figura 2. Estas células se tornam colunares quando estimuladas pelo hormônio estimulante da tireoide (TSH), proveniente da hipófise anterior. As células foliculares produzem tireoglobulina, a qual é uma grande glicoproteína essencial para a síntese dos hormônios tireoideos (HT). Esta glicoproteína é liberada da célula folicular para dentro do lúmen do folículo (CINGOLANI HE E HOUSSAY AB, 2004).

Fig. 2: Células epiteliais foliculares da tireoide. Note o lúmen folicular.



1.2 Organização do Iodo

Os hormônios tireoideos são únicos por conter iodo em sua estrutura.

O iodo entra no corpo através da alimentação ou da água. Durante a evolução, o iodo foi levado do solo para os oceanos e, conseqüentemente, regiões montanhosas e longes do mar são escassas neste elemento.

A glândula tireoide concentra e armazena o iodo, assim como sintetiza a tireoglobulina e armazena os HT na tireoglobulina, o que compensa a escassez de iodo.

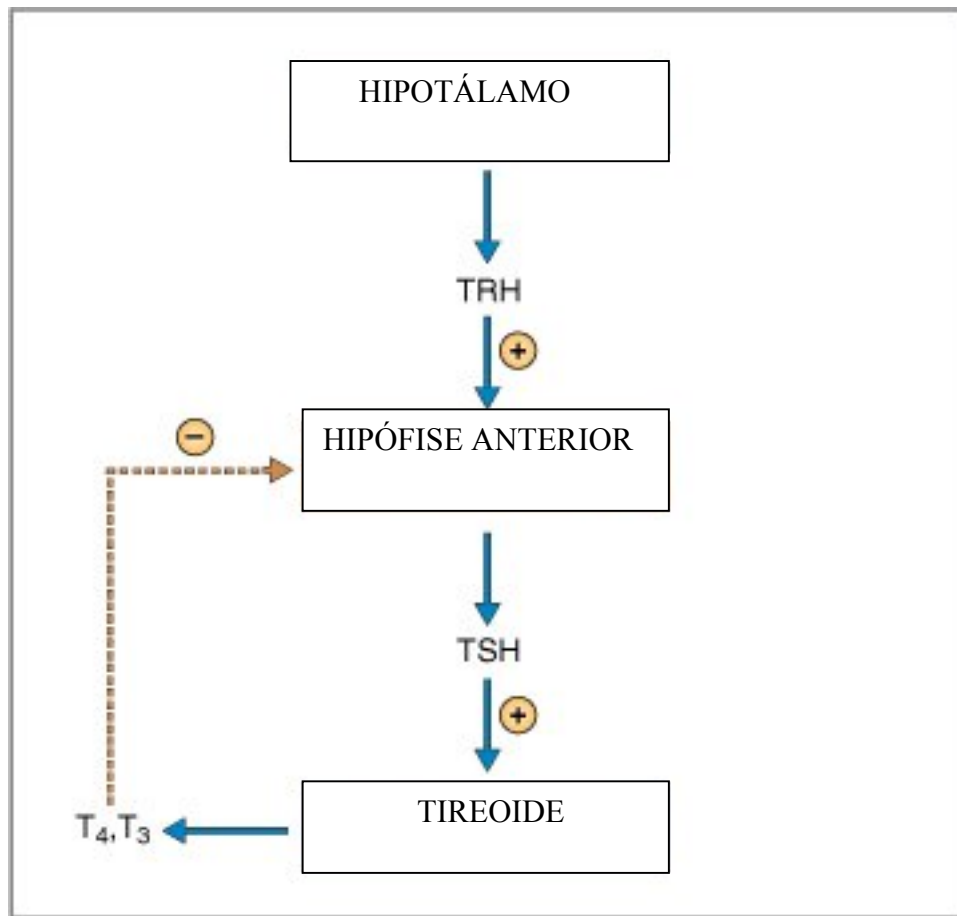
As tirosinas iodadas são derivadas da iodação da tireoglobulina para formar

moniodotironina ou diiodotironina, as quais são acopladas para formar os hormônios da tireoide (CINGOLANI HE E HOUSSAY AB, 2004).

1.3 Síntese e transporte dos hormônios tireoidianos

A tireoide produz os hormônios T4 (tetraiodotironina ou tiroxina), T3 (triiodotironina) e T3r (triiodotironina reverso), sendo que esta produção ocorre na interface célula-colóide. A produção e secreção hormonal são estimuladas pelo TSH. Este, por sua vez, é estimulado pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH), proveniente do hipotálamo (YEN, 2001). A concentração de cada um desses hormônios é mantida dentro de limites fisiológicos por mecanismos de retroalimentação negativa, através da alça hipotálamo – hipófise – glândula periférica. Dessa forma, o excesso de T4 e T3 circulantes (na forma livre) produzem retroalimentação para a hipófise anterior reduzir a secreção de TSH e efeito oposto ocorre quando a concentração desses hormônios caem para valores infra-fisiológicos, como mostrado na figura 3. Da mesma forma, estes hormônios agem sobre o hipotálamo controlando a liberação de TRH (não mostrado na figura 3). Em ambos, hipófise anterior e hipotálamo, o T3 é o principal responsável pela regulação por retroalimentação negativa (CINGOLANI HE E HOUSSAY AB, 2004).

Fig. 3: Representação da retroalimentação negativa dos HT sobre a hipófise anterior.



© Elsevier. Costanzo: Physiology 3E www.studentconsult.com

A síntese dos hormônios da tireoide envolve a tireoglobulina e uma enzima essencial chamada tireoide peroxidase. A síntese ocorre em seis etapas principais: o transporte ativo de I^- através da membrana da célula folicular tireoidea e conseqüente entrada na célula folicular, a oxidação da iodase e iodação de resíduos de tirosina na tireoglobulina, acoplamento de moléculas de iodotironina dentro da tireoglobulina para formar T3 e T4, proteólise da tireoglobulina, com liberação de iodotironinas livres e iodotirosinas, deiodação das iodotirosinas dentro da célula epitelial tireoidea, com conservação e reutilização das iodases liberadas e, em algumas situações, conversão de T4 a T3. No entanto, esta última etapa geralmente não ocorre dentro da glândula tireoide, portanto o T4 geralmente é o produto

primário da secreção tireoidiana (YEN, 2001).

O T4 funciona como pré – hormônio para o T3, já que sua ação é muito menor que de T3 e, portanto, convertido em T3, através de deiodação pela ação da enzima 5'- deiodase. Essa conversão, como dito anteriormente, geralmente não ocorre na glândula tireoidea, ao invés, a maior parte da conversão ocorre nos tecidos periféricos com altos fluxos sanguíneos e trocas rápidas com plasma, como o fígado e os rins. Os outros tecidos irão em seguida, captar este T3 circulante. Alguns tecidos, como músculo esquelético músculo cardíaco e a própria glândula tireoide, possuem quantidades pequenas da enzima 5'- deiodase (BRIX K *et al*, 2011).

Portanto, a maior parte do T3 plasmático é derivado do metabolismo periférico do T4 (5'deiodação). Este processo de deiodação que resulta na formação de T3 é muito importante, já que este é três a oito vezes mais potente que T4.

Os HT são transportados no sangue através de proteínas transportadoras. Embora apenas cerca de 0,04% do T4 e 0,4% do T3 estarem sob a forma livre, são estas frações livres que são as responsáveis pela atividade hormonal e pelo controle por retroalimentação negativa.

Existem três proteínas carreadoras principais para os HT: a globulina ligante de tiroxina (TBG), a pré-albumina ligante de tiroxina (PALT) e a albumina. Cada molécula de TBG se liga a uma molécula de T4. Cerca de 70% de T4 e T3 circulantes são ligados a TBG, em comparação com cerca de 10 a 15% fixadas a PALT e 15% ligadas a albumina. Em comparação com a TBG, a PALT e a albumina têm afinidades muito mais baixas, dessa forma, a TBG mantém grande reservatório de T4 e tampona as modificações agudas na função da tireoide. Já os papéis da PALT e da albumina consistem em levar T4 e T3 até as células. No entanto, diminuição ou aumento á longo prazo na produção e secreção de T4, causados por doença da tireoide, evidentemente causarão diminuições ou aumentos de T4

livre que se mantém enquanto houver alteração no funcionamento da glândula (CINGOLANI HE E HOUSSAY AB, 2004; GREENSPAN, F. S AND STREWLER, 2003).

1.4 Ações gerais dos hormônios tireoideos e o hipertireoidismo

Para que seja mantida a homeostase (constância do meio interno), é necessária a interação perfeita entre os diferentes sistemas que compõem este organismo.

Os hormônios tireoideos exercem uma ampla gama de ações fisiológicas sobre os mais diversos sistemas do organismo, sendo, portanto, de importância fundamental para a homeostase.

O hipertireoidismo, o qual se caracteriza pelo excesso de secreção de hormônios tireoideos resulta da hiperatividade da glândula. As conseqüências do hipertireoidismo para o funcionamento geral do organismo são muitas, afetando diferentes órgãos e sistemas.

1.4.1 Os receptores dos hormônios tireoideos

As ações dos HT resultam principalmente da interação do T3 com receptores nucleares que interagem com sítios reguladores de genes, modificando sua expressão.

As frações livres dos HT são transportadas através de difusão passiva e de proteínas carreadoras específicas dependentes de energia para dentro da célula, para se ligar a receptores específicos no núcleo celular. Dentro da célula, ocorre a conversão do T4 para T3 (YEN, 2001).

Nos seres humanos, existem dois genes para o receptor dos hormônios tireoideos (RT), α e β . O RT α está localizado no cromossomo 17 e o RT β está localizado no cromossomo 3.

Cada gene produz pelo menos dois produtos. Dessa forma, existem pelo menos quatro RT: RT α 1, RT α 2, RT β 1 e RT β 2, embora alguns estudos já demonstrem a existência de um quinto receptor denominado RT β 3 (KAHALY & DILLMANN, 2005). Cada um destes RT possui três domínios: um domínio independente de ligante na região amino terminal, um domínio de ligação ao DNA localizada centralmente, com dois resíduos de cisteína e um domínio de ligação a um ligante, na região carboxi-terminal. A concentração destes receptores nos diversos tecidos varia de acordo com o estágio de desenvolvimento e o tecido propriamente dito (GREENSPAN, F. S AND STREWLER, 2003).

Os RT podem se ligar a elementos responsivos tireoideos (ERT) no DNA mesmo na ausência de T3. Os ERT estão localizados próximos e, geralmente, acima em relação ao local de início da transcrição gênica, aos promotores. A ligação de T3 aos RT, resulta em ativação, ou em alguns casos, inibição, da transcrição desses genes, com conseqüente mudanças nos níveis de RNAm transcritos. A alteração dos níveis de RNAm levará a alterações dos níveis de proteínas específicas produzidas a partir da tradução destes RNAm. Estas proteínas são as responsáveis pela ação hormonal (CHENG SY *et al*, 2010).

Os RT geralmente funcionam como heterodímeros com outros fatores de transcrição, como por exemplo, o receptor retinóico X e o receptor do ácido retinóico.

Além de efeitos resultantes da ligação a receptores nucleares, é importante considerar que efeitos chamados extranucleares, estimulando a atividade de proteínas específicas, independentemente da ligação com receptores nucleares têm sido descritos (OJAMAA *et al.*, 1993). Nos últimos anos, foi identificado que a porção extracelular da integrina α V β 3 atua como receptor de membrana para o hormônio da tireoide (CAO, KAMBE E SEO, 2006).

1.4.2 Efeitos fisiológicos dos HT

A) Ações genômicas

Os efeitos transcricionais de T3 levam horas ou dias para alcançar seus resultados plenos. Estas ações genômicas resultam em grande número de efeitos, como o crescimento tecidual, a maturação cerebral, o aumento da produção de calor e consumo de oxigênio ((YEN, 2001; CHENG SY *et al*, 2010).

B) Ações não – genômicas

Algumas ações do HT são não – genômicas, como por exemplo, o aumento do transporte de glicose e aminoácidos (YEN, 2001).

T3 aumenta o consumo de oxigênio e a produção de calor em parte através da estimulação da $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase em todos os tecidos, exceto o cérebro, baço e testículos. Este efeito contribui para o aumento da velocidade do metabolismo basal e, no hipertireoidismo, contribui para o aumento da sensibilidade ao calor (GREENSPAN, F. S AND STREWLER, 2003).

Efeitos endócrinos

Os HT aumentam a síntese e a degradação de muitos hormônios e agentes farmacológicos. Por exemplo, a meia – vida do cortisol é de aproximadamente 100 minutos em um indivíduo normal (eutireoideo). No entanto, no indivíduo com hipertireoidismo, esta meia – vida parece ser de cerca de 50 minutos. Consequentemente, a produção de cortisol

pelo córtex supra – renal irá aumentar, mantendo concentrações normais de cortisol circulante. (GREENSPAN, F. S AND STREWLER, 2003).

Estes supostos efeitos sobre a função da glândula supra – renal no hipertireoidismo serão discutidos posteriormente.

1.5 Fisiologia da contração muscular cardíaca

1.5.1 Acoplamento excitação – contração no músculo estriado cardíaco

Acoplamento excitação contração é o processo que ocorre desde a despolarização da membrana excitável até a liberação de cálcio do Retículo sarcoplasmático (RS) e contração da célula muscular.

A figura 04 mostra esquematicamente o acoplamento excitação – contração no músculo estriado cardíaco.

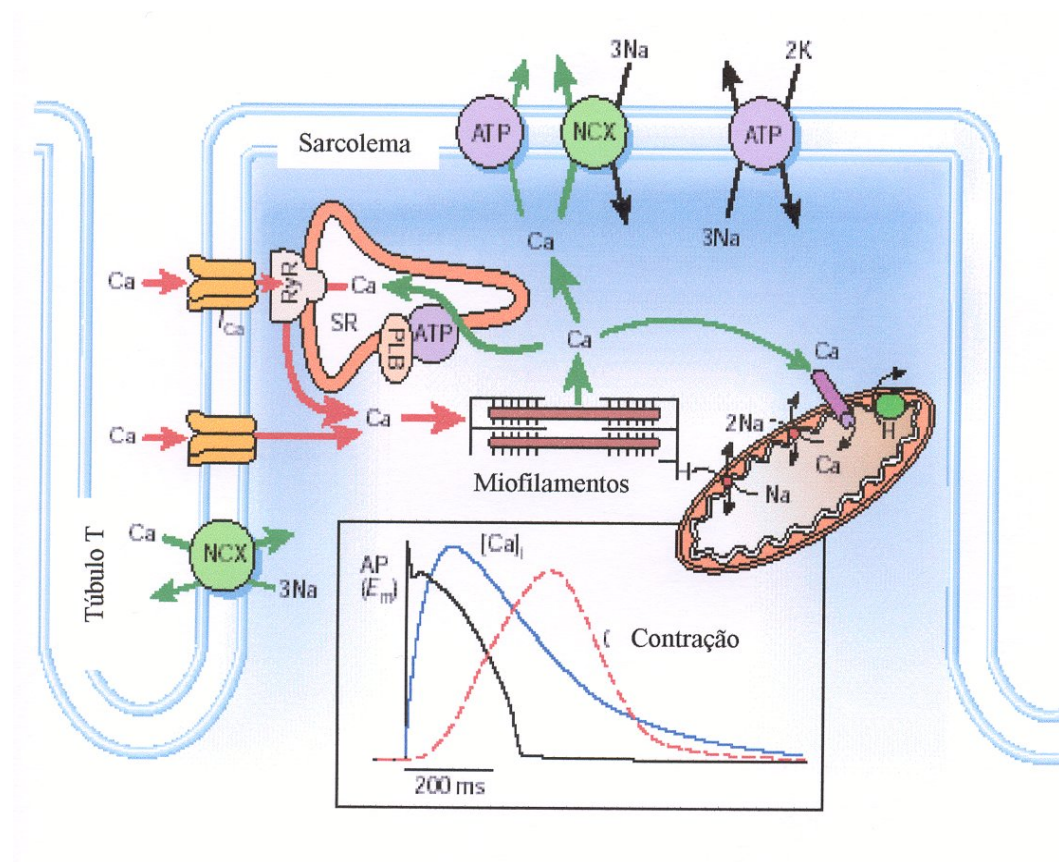
O íon cálcio é essencial para atividade elétrica cardíaca juntamente com outros íons, sendo o ativador direto dos miofilamentos, induzindo contração, o que propulsiona o sangue (CINGOLANI HE E HOUSSAY AB, 2004).

Durante o potencial de ação cardíaco, que será explicado mais em detalhes posteriormente, íons cálcio provenientes do meio extracelular alcançam o meio intracelular principalmente através dos canais lentos de cálcio, também chamados receptores dihidropiridínicos - DHPRs, contribuindo para o platô do potencial de ação. Além disso, existe uma contribuição de menor significância do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ agindo no sentido reverso, desta forma ajudando a elevar os níveis intracelulares de cálcio. O aumento do cálcio intracelular estimula (entre 2 e 3 ms) a abertura de canais de liberação de cálcio na membrana do retículo sarcoplasmático, chamados canais rianodínicos, e a combinação destas duas vias

eleva a concentração intracelular deste íon e, como consequência da ligação do mesmo a sítios de baixa afinidade presente na subunidade da troponina C, provocam a ativação da contração muscular. É notável o fato que apenas uma pequena fração dos canais lentos de cálcio e dos canais rianodínicos do RS precisam abrir para produzir o fluxo adequado de cálcio (BERS, 2001).

No músculo cardíaco, o cálcio age principalmente como fator excitatório no processo contrátil. De modo inverso, uma diminuição da concentração fisiológica deste íon produz um efeito inotrópico negativo, ou seja, diminuindo a força de contração muscular, conseqüentemente diminuindo o débito cardíaco (CINGOLANI HE E HOUSSAY AB, 2004).

Figura 04 – Acoplamento excitação contração no músculo cardíaco.



FONTE: Bers, Donald M. Excitation Contraction Coupling and Cardiac Contraction Force, Kluwer Academic Publishers, 2001; 02-03. A propagação de PA pelo sarcolema e túbulos – t acarreta influxo pequeno de íons Ca^{2+} através dos DHPR. Por meio do mecanismo “ Ca^{2+} induz a liberação de Ca^{2+} ”, os íons Ca^{2+} provenientes do LEC induzem a liberação de íons Ca^{2+} do RS através dos RyR presentes nas membranas das cisternas terminais do RS. A ligação dos íons Ca^{2+} às TnC ativa o ciclo de pontes cruzadas, ocorrendo a sístole. A seguir, os íons Ca^{2+} são recaptados para o RS por meio de bombas de Ca^{2+} denominadas SERCA2, as quais estão sob regulação da proteína fosfolambano e removidos para o LEC através de trocadores $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$, ocorrendo a diástole. Bombas de Ca^{2+} presentes no sarcolema e uniportes para Ca^{2+} presentes na membrana mitocondrial completam a remoção de íons Ca^{2+} do sarcoplasma. Bombas de Na^+K^+ presentes no sarcolema asseguram a manutenção dos gradientes iônicos para Na^+ e K^+ . O quadro abaixo mostra as relações entre o PA, a concentração intracelular de íons Ca^{2+} e a contração muscular.

1.5.2 Estruturas envolvidas no processo de acoplamento excitação contração do músculo estriado cardíaco

Como definido anteriormente, acoplamento excitação - contração é o processo que ocorre desde a despolarização da membrana excitável até a liberação de cálcio do RS e a contração da célula muscular.

1.5.2.1 Sarcolema e Túbulos Transversos

O sarcolema e os túbulos transversos (Túbulos – T) são estruturas de membrana contínuas que formam uma barreira semi-permeável entre o interior da célula muscular cardíaca e o meio extracelular. Embora o nome sugira, na verdade os túbulos transversos (Túbulos T) existentes nas células cardíacas possuem vários componentes longitudinais e oblíquos, além de serem muito mais largos que os da célula muscular estriada esquelética, como mostrado na figura 02 (BERS, 2001; CINGOLANI HE E HOUSSAY AB, 2004). Nestas estruturas de membrana se localizam canais iônicos, transportadores de membrana e outras especializações de membrana. Canais de sódio, canais de potássio e bombas de Na^+/K^+ -ATPase são mais frequentes no sarcolema do que na superfície dos Túbulos-T em músculo estriado esquelético. Por outro lado, a densidade de canais de Cálcio (como canais dihidropiridínicos - DHPRs) é quatro vezes maior nos Túbulos -T (ALMERS *et al.*, 1975). Ainda, 30 a 50% da área sarcolemal de ventrículo de mamíferos é composta de Túbulos -T, e em átrio esta porcentagem cai para apenas 15% ou menos (BERS, 2001). Além disso, o diâmetro das células atriais é menor que o das células ventriculares em mamíferos e portanto necessitam menos Túbulos-T para ativação do que as células ventriculares (BERS, 2001).

Os Túbulos-T, no músculo estriado esquelético, estão envolvidos em complexos triádicos com o Retículo Sarcoplasmático (RS), onde dois lados de Túbulo-T, em sua face citoplasmática, estão justapostas e se acoplam com uma cisterna terminal de RS. Porém, em músculo estriado cardíaco, este acoplamento entre Túbulo- T e RS ocorre mais comumente como complexos diádicos, podendo ocorrer na superfície do sarcolema, ocupando 4 a 8% da área de superfície sarcolemal e na superfície dos Túbulos- T, ocupando 20 a 50% da área de superfície dos Túbulos-T (REED *et al*, 2000; BERS, 2001).

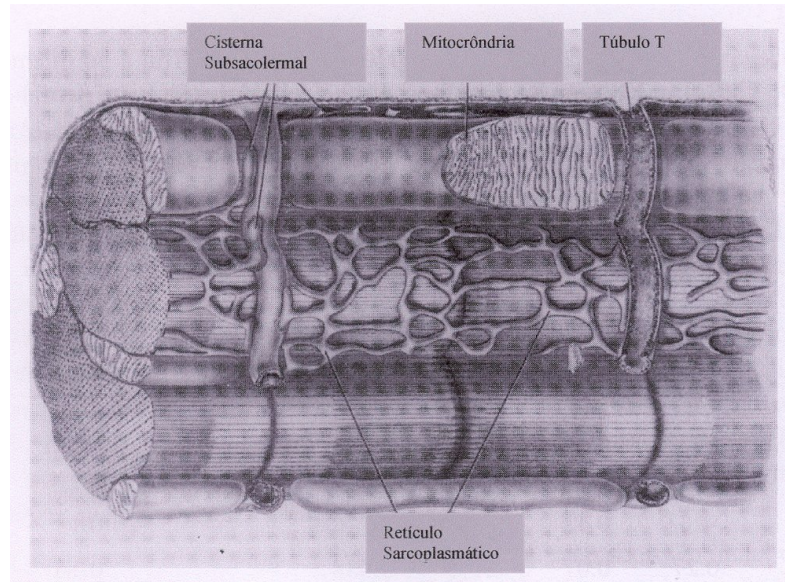
A figura 05 representa a organização estrutural das células musculares de músculo estriado cardíaco de mamíferos.

As invaginações de membrana denominadas cavéolas de 50 à 80 nm de diâmetro, ocupam cerca de 10% da superfície sacolermal e de túbulos-T. Nestas cavéolas localiza-se a proteína caveolina-3, bem como proteínas receptoras sinalizadoras como sintase do óxido nítrico e a proteína quinase C (SONG *et al.*, 1999; FERON & BALLIGAND, 2006; RYBIN *et al.*, 2004).

Discos intercalados também ocorrem na superfície do sarcolema e separam uma célula cardíaca da outra. Estes discos possuem três regiões diferenciadas. A primeira conhecida como junção aberta são as predominantes nos discos intercalados e servem como vias de baixa resistência elétrica, permitindo assim que as células musculares cardíacas funcionem como um sincício elétrico. A segunda região é conhecida como junção intermediária e a terceira como desmossomo. Estas últimas constituem importantes conectores mecânicos entre as células cardíacas (REED *et al*, 2000; BERS, 2001).

É importante ressaltar que as células musculares estriadas cardíacas (miócitos) estão em proximidade com o espaço vascular, que ocupa cerca de 59% do espaço extracelular cardíaco, permitindo desta forma um fácil acesso ao conteúdo vascular necessário para o metabolismo fornecedor de energia para estes miócitos (BERS, 2001).

Figura 05 – Diagrama esquemático dos túbulos t e retículo sarcoplasmático e miofilamentos em músculo estriado cardíaco de mamíferos.



Fonte: Bers, Donald M. Excitation Contraction Coupling and Cardiac Contraction Force, Kluwer Academic Publishers, 2001; 02-03.

1.5.2 Retículo Sarcoplasmático (RS)

O RS é uma organela fundamental no processo de acoplamento-excitacão-contração de todas as células musculares, embora seja mais abundante em células musculares esqueléticas do que em miócitos, o que demonstra sua maior contribuição para ativação da contração na célula muscular estriada esquelética.

O RS armazena íons Cálcio e libera íons Cálcio para o sarcoplasma. O local principal de liberação de íons Cálcio é a cisterna terminal do RS. Nesta região se encontra uma proteína que está ancorada na membrana da cisterna terminal do RS e esta proteína projeta alças em formato de “dedos de pé” para a superfície externa do RS. Esta proteína é conhecida como receptor rianodínico (devido a alta afinidade do alcalóide rianodina). Este receptor é um canal de liberação de Cálcio. Cada monômero tem massa molecular de 560 kDa, sendo que o receptor é formado por quatro subunidades (WAGENKNECHT & RADERMACHER, 1997;

FLEISCHER *et al.*, 1988; WAGENKNECHT & SAMSO, 2002; WAGENKNECHT & RADERMACHER, 1995). Um receptor rianodínico (RyR) se acopla com dois DHPRs em células musculares esqueléticas e quatro RyR se acoplam com dez DHPRs em miócitos ventriculares de mamíferos (BERS & STIFFEL, 1993; WIBO *et al.*, 1991). Este acoplamento funcional permite que um potencial de ação propagado através da membrana do sarcolema e/ou túbulo-T seja transmitido pelos DHPRs para os RyR levando a liberação de Cálcio para o mioplasma da célula muscular.

A membrana do RS é aproximadamente homogênea, com exceção das regiões de acoplamento entre RS, sarcolema e túbulos-T. Dessa forma, existem duas porções típicas do RS: uma porção longitudinal (Retículo Sarcoplasmático Longitudinal – RSL) e uma porção juncional (Retículo Sarcoplasmático Juncional – RSJ) que é a região do RS mais próxima dos túbulos T (JIANG M, 2006). Nestas porções da membrana do RS localiza-se a bomba de Cálcio, importantíssima para remoção dos íons Cálcio do mioplasma para dentro do RS (REED *et al*, 2000).

Na cisterna terminal do RS existe uma proteína que se liga aos íons Cálcio com alta capacidade e baixa afinidade conhecida como calsequestrina. Esta mantém um estoque de íons Cálcio que podem prontamente ser usados para contração, ao mesmo tempo que diminui a concentração de íons Cálcio livres no RS, minimizando a energia necessária para remoção dos íons Cálcio do mioplasma para dentro do RS pela bomba de Cálcio do RS (REED *et al*, 2000; BERS, 2001).

A localização de proteínas do RS foi estudada por Scriven *et al.* (2000). Primeiramente foi encontrado que todos os DHPRs se encontram próximos dos RyR, entretanto alguns RyR não se encontram próximos de DHPRs. Canais de Sódio e trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ não estão localizados nas regiões de acoplamento entre DHPRs e RyR, portanto, estes teriam função limitada no acoplamento excitação contração. No entanto, alguns estudos

mostram que correntes de Na^+ não dependentes de voltagem como a I_f e trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ podem ter importante função no automatismo e no AEC do músculo cardíaco (REED *et al*, 2000, MANGONI ME AND NARGET J, 2008).

1.5.2.2 Mitocôndria

Em mamíferos, 35% do volume das células musculares ventriculares é ocupado por mitocôndrias, já que estas são as responsáveis pela grande produção de energia necessária para o funcionamento das células musculares estriadas cardíacas. A produção de energia ocorre através da fosforilação oxidativa e do ciclo do ácido cítrico. No coração, as mitocôndrias são usualmente cilíndricas, embora possam se achatar um pouco por falta de espaço dentro das células (CINGOLANI HE E HOUSSAY AB, 2004; BERS, 2001).

Além de gerar energia para a contração muscular, as mitocôndrias possuem papel direto, ainda que muito pequeno, no acoplamento excitação – contração da célula muscular cardíaca.

A mitocôndria possui sistema de uniporte de íons cálcio que captura o íon para o interior da organela, contribuindo para o relaxamento da célula muscular cardíaca. Porém, esta contribuição é de 1% a no máximo 3% do total de íons cálcio que são recaptados durante o relaxamento muscular (BERS, 2001).

1.5.2.3 Miofilamentos

Os miofilamentos ocupam 45 à 60% do volume celular em ventrículo de mamíferos e uma fração menor que esta em átrio e células de Purkinge (especializadas em condução

elétrica). São compostos de filamentos finos (actina), filamentos grossos (miosina), proteínas contráteis associadas e proteínas do citoesqueleto, como mostrado na figura 6.

Os miofilamentos são os responsáveis pela transdução da energia química em energia mecânica e trabalho na forma de contração muscular.

Cada filamento grosso contém cerca de trezentas moléculas de miosina além de outras proteínas como titina e proteína-C. Cada cadeia pesada de miosina, com peso molecular (PM) de 450.000 possui uma longa α -hélice e uma cabeça globular, com atividade ATPase, a qual forma as pontes cruzadas que interagem com a actina no filamento fino (BERS, 2001).

O filamento fino possui duas cadeias da proteína globular actina-G, formando um polímero filamentar chamado actina-F. A tropomiosina (TM) é uma proteína longa flexível em α -hélice que cobre sete monômeros de actina (LEHRER *et al.*, 1997). Um complexo Troponina se liga a tropomiosina e assim a actina a cada sete monômeros de actina. Este complexo é formado de três subunidades: Troponina-C (TnC), que é a subunidade ligadora de Cálcio, Troponina-T (TnT), que é a subunidade que se liga a tropomiosina e a Troponina-I (TnI), que é a subunidade inibidora e que também se liga a actina. A TnT possui uma região carboxi-globular e uma forma alongada que percorre a molécula de tropomiosina e três monômeros de actina, assim a TnT pode controlar a posição da TM. A TnI, próximo de sua região amino-terminal, interage com a região carboxi-terminal de ambas TnT e TnC. Esta interação depende da ligação de íons Cálcio ou Magnésio no sítio carboxi-terminal da TnC, que em geral, está quase totalmente ocupado. Durante o relaxamento da célula muscular, a região carboxi-terminal da TnI também se liga a actina, impedindo a cabeça da miosina de se ligar com a actina. Após o aumento da concentração intracelular de íons Cálcio, estes se ligam na região amino-terminal da TnC, o qual possui um sítio de ligação para Cálcio e dois sítios que ligam íons Cálcio ou Magnésio competitivamente, então, parte da TnC se liga a região

O fluxo de cálcio para o interior da célula cardíaca se faz, como dito anteriormente, principalmente através de canais lentos dependentes de voltagem (canais de Cálcio tipo L). A regulação destes canais dá-se por vários mecanismos, incluindo: níveis de adenosina trifosfato (ATP), mudanças no pH celular e os níveis de nucleotídeos cíclicos como o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e o monofosfato cíclico de guanina (GMPc). O AMPc, presumivelmente através da fosforilação dos canais ou de proteínas quinases (PK-A) reguladoras, estimula a abertura destes canais, aumentando o fluxo de cálcio para o interior da célula e iniciando a contração muscular. A formação de AMPc é regulada ou estimulada pela ação de uma série de agentes, incluindo o neurotransmissor simpático noradrenalina ou a epinefrina circulante. Ambos através da ligação com receptores beta-adrenérgicos. Outros agentes capazes de elevar os níveis de AMPc são a histamina, e inibidores da fosfodiesterase como a teofilina e a cafeína.

Já o GMPc tem efeito antagônico, ou seja, fosforila proteínas quinases inibitórias (PK-G), que inativam os canais lentos de cálcio. A ativação de receptores muscarínicos pela acetilcolina (neurotransmissor parassimpático), aumenta os níveis celulares de GMPc, diminuindo a contração muscular. Os níveis de ATP estão principalmente relacionados a canais de potássio, os quais têm sua atividade suprimida quando os níveis celulares daquele elemento estão diminuídos, o que ocorre, por exemplo, durante isquemia ou hipóxia. A menor atividade dos canais de potássio reduz o efluxo deste íon, levando a um menor nível do potencial elétrico transmembrana, diminuindo a contração muscular.

Além dos canais lentos de cálcio, o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, atuando de forma reversa também pode levar ao influxo de cálcio e disparar a liberação deste íon do RS, contudo, sob condições fisiológicas sua contribuição para a elevação na concentração mioplasmática de íons cálcio parece ser menor que a dos canais lentos de cálcio (REED *et al*, 2000; CINGOLANI HE E HOUSSAY AB, 2004).

Além dos mecanismos citados, o músculo cardíaco tem ainda uma variedade de vias intrínsecas e extrínsecas de regulação do influxo de cálcio. Esses mecanismos asseguram que a força e frequência de contração sejam controladas e ajustadas à demanda fisiológica (SPERELAKIS *et al.*, 1996; SPERELAKIS *et al.*, 1994).

1.5.4 Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2) e fosfolambano (FL)

A velocidade de sequestro de íons cálcio para dentro do retículo sarcoplasmático (RS) é o maior determinante da velocidade de relaxamento muscular (LEWARTOWSKI & WOLSKA, 1993).

O RS tem um papel central na contração e no relaxamento cardíaco através da regulação da concentração intracelular de cálcio.

Existe um conjunto de bombas de Cálcio que se localizam na membrana do retículo sarcoplasmático (em células musculares) e endoplasmático (em células não – musculares) (SERCAs) que recapturam cálcio do meio intracelular para dentro da organela, levando a um relaxamento da célula muscular.

A deficiência de recaptção de cálcio para dentro do RS que ocorre em várias condições fisiopatológicas, inclusive em vários tipos de patologia cardíaca, entre elas, em vários subtipos de cardiomiopatias hipertróficas familiares (FHC), se torna mais aparente a altas frequências de estimulação (à partir de 2 Hz) (SUGIYAMA *et al.*, 1999). Segundo Sugiyama *et al.*, (1999), a inabilidade de recaptar e liberar íons cálcio suficiente para e do RS atenua o aumento da força que é normalmente observado a altas frequências de estimulação (a relação força frequência positiva). Porém, as baixas frequências de estimulação (0,2 a 0,5 Hz), o intervalo de tempo disponível para recaptção de cálcio para o RS parece ser suficiente, portanto havendo pouca ou nenhuma diferença entre camundongos controle e camundongos

portadores de uma patologia cardíaca específica que leva a deficiência da recaptção de cálcio para o interior do RS.

Durante o acoplamento excitação - contração, a liberação de cálcio do RS também contribui para inativação dos canais lentos de cálcio dependente de voltagem em aproximadamente 50%. Portanto, a liberação de cálcio pelo RS e o influxo do mesmo através dos canais lentos de cálcio criam um mecanismo de retroalimentação no influxo de íons cálcio. Desta forma, quando o influxo ou a liberação de íons cálcio é alto, existem mecanismos que impedem a sua continuidade. Este mecanismo eficiente de retroalimentação mostra o curtíssimo espaço de tempo entre o influxo de cálcio através dos canais lentos de cálcio do sarcolema e a liberação de cálcio do RS através dos canais rianodínicos (BERS, 2001).

Estudos nos quais a isoforma cardíaca de SERCA, chamada SERCA2, foi superexpressada (CHAUDHRI *et al.*, 2002; DAVIA *et al.*, 2001) foi encontrado aceleração da velocidade de relaxamento cardíaco e, portanto elevação dos parâmetros contráteis, assim como estudos em camundongos heterozigotos para SERCA2 resultaram em diminuição da pressão ventricular sistólica e das velocidades de contração e relaxamento. Entretanto, camundongos os quais a expressão de SERCA2 foi totalmente inibida morrem ainda no útero (REDWOOD *et al.*, 1999). Por outro lado, Sugiyama *et al.*, (1999), também estudando os efeitos da superexpressão de SERCA2, encontrou um efeito na habilidade do RS em estocar cálcio, aumentando os depósitos de cálcio no RS, portanto aumentando a disponibilidade de cálcio para ser liberado durante cada batimento cardíaco, principalmente a altas frequências de estimulação. No entanto não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo superexpressando SERCA2 na velocidade de relaxamento cardíaco. Embora esta velocidade de relaxamento cardíaco tenha sido maior nos animais do grupo superexpressando SERCA2, não foi alcançado valores estatisticamente significativos. Além disso, os camundongos

superexpressando SERCA2 exibiram uma relação força - frequência positiva, enquanto esta relação foi atenuada no grupo controle (sem superexpressão de SERCA2) e também apresentaram um aumento da amplitude do cálcio transiente comparado com o grupo controle e um aumento da geração de força em altas frequências de estimulação (2 Hz), demonstrando sua maior habilidade para estocar cálcio no RS.

As enzimas transportadoras de cálcio presentes na membrana do RS (SERCAs) estão ligadas a uma fosfoproteína chamada fosfolambano que funciona inibindo continuamente estas bombas, porém, após fosforilação do fosfolambano, pela proteína quinase A (PKA) ou pela proteína quinase C (PKC), devido ao aumento da concentração intracelular do segundo mensageiro monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c) e consequente aumento da concentração intracelular de PKA ou devido ao aumento da concentração intracelular do segundo mensageiro diacilglicerol e consequente aumento da concentração intracelular de PKC, esta inibição é atenuada e as bombas aumentam grandemente sua atividade (WOLSKA *et al.*, 1998). Portanto, deve haver uma perfeita relação entre inibição e liberação para um funcionamento adequado do músculo cardíaco.

Camundongos nos quais a expressão de fosfolambano (FL) foi totalmente inibida são viáveis e indistinguíveis dos camundongos não - transgênicos em nível histológico. Porém, estudos bioquímicos e fisiológicos indicam uma afinidade maior da SERCA2 por cálcio e aumento das velocidades de contração e relaxamento. Além disso, há uma atenuação da estimulação dos parâmetros contráteis por agonistas α -adrenérgicos (PRABHAKAR *et al.*, 2001). Por outro lado, camundongos transgênicos superexpressando duas vezes mais FL, apesar de também não apresentarem alterações morfológicas, demonstram uma diminuição das velocidades de contração e relaxamento e esta diminuição está provavelmente associada à uma menor afinidade da SERCA2 por Cálcio (PRABHAKAR *et al.*, 2001).

1.5.5 Relaxamento da célula muscular cardíaca

Para que o relaxamento da fibra muscular ocorra é necessário que a concentração intracelular de íons cálcio diminua para os valores de repouso. Isso é conseguido por intermédio de três principais mecanismos:

1. A ativação da cálcio adenosina trifosfatase (SERCA2) na membrana do retículo sarcoplasmático, o que promove a recaptção do cálcio pelo retículo, sendo que este é o principal mecanismo recaptador de cálcio.

2. A ativação da Ca^{+2} -ATPase do sarcolema, a qual permite a saída do íon para o meio extracelular. O estímulo para que esses dois processos ocorram parece ser o próprio aumento do cálcio intracelular.

3. O trocador Na^{+} - Ca^{+2} presente na membrana celular, o qual utilizando a energia proveniente do gradiente eletroquímico do íon sódio transporta 3 íons sódio para o meio extracelular e um íon cálcio no sentido inverso. Tal mecanismo opera também em sentido reverso. Portanto, este sistema contribui tanto para a elevação quanto para a diminuição da concentração de cálcio intracelular, modulando assim a contração e o relaxamento. Além disso, com a repolarização celular ocorre a inativação dos canais lentos de cálcio, impedindo o fluxo do íon para o interior do sarcoplasma.

Além destes mecanismos, as mitocôndrias possuem um uniporte de cálcio, porém a contribuição para o relaxamento muscular é mínimo. Além destes, o sarcolema também possui uma canal transiente de cálcio, porém, este é quase inexistente na maioria dos miócitos ventriculares.

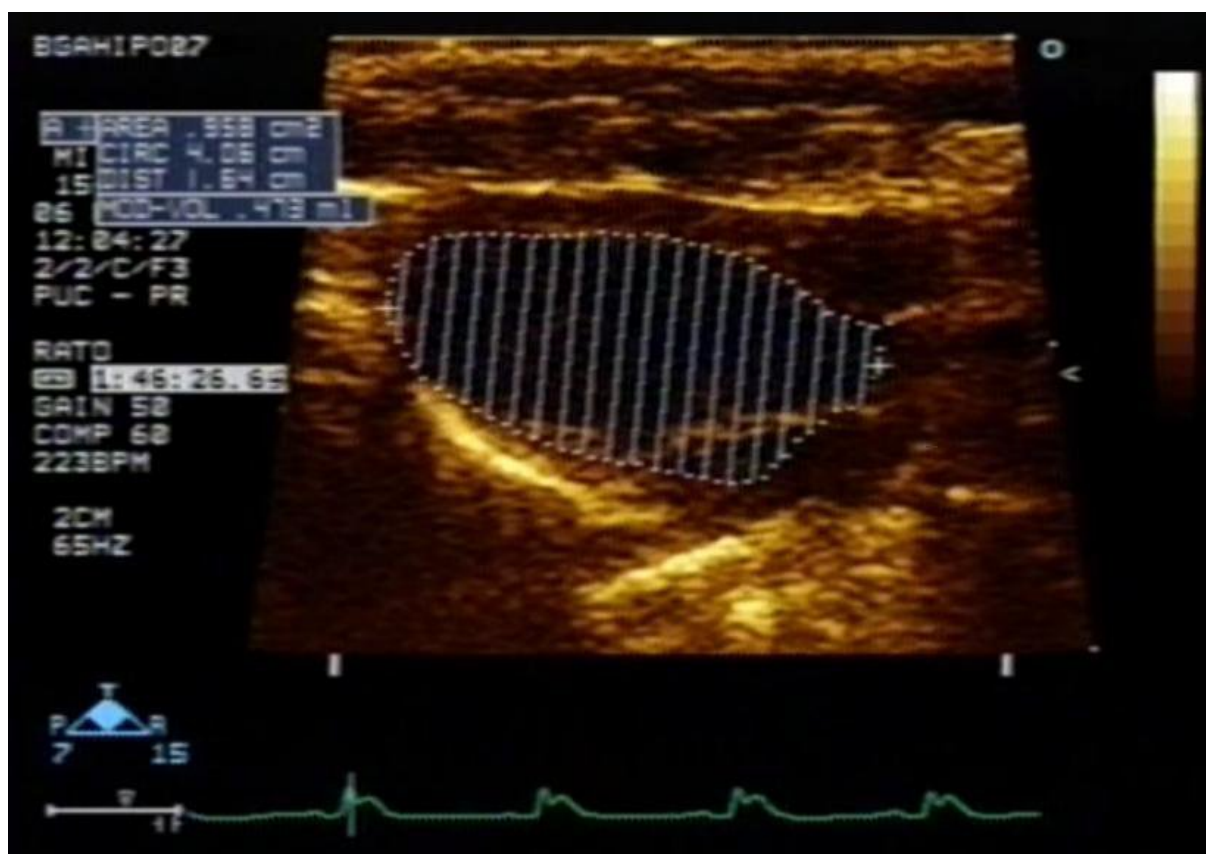
1.6 O Ciclo Cardíaco

Para que se compreenda as diferentes fases de ação do músculo cardíaco e conseqüente fluxo de sangue pelo sistema circulatório, faz – se necessário uma revisão de cada fase do ciclo cardíaco.

A fase diastólica do ciclo começa com a abertura das válvulas atrioventriculares (AV). Quando a pressão do ventrículo esquerdo se torna menor que a do átrio esquerdo a válvula mitral se abre dando início a fase de enchimento ventricular. Em seguida, as pressões em ambas as câmaras elevam-se lentamente à medida que o átrio e o ventrículo continuam se enchendo passivamente em harmonia com o retorno do sangue ao coração através das veias (MOHRMAN E HELLER, 2007). A contração atrial é iniciada próximo do final da diástole ventricular disparada pela despolarização das células atriais. À medida que estas células desenvolvem tensão, e se encurtam, a pressão atrial aumenta, e quantidade de sangue adicional flui para o ventrículo. (MOHRMAN E HELLER, 2007). A sístole ventricular inicia quando o potencial de ação ao se propagar pelo nodo AV e sistema de His Purkinje, dá origem a despolarização das células do músculo ventricular. A contração das células do músculo ventricular disparada pelo potencial de ação faz com que a pressão intraventricular aumente acima daquela do átrio, o que causa fechamento abrupto da válvula AV. À medida que a contração ventricular se intensifica a pressão ventricular continua a aumentar. Estando a pressão ventricular em níveis maiores do que a atrial, porém, menores do que a existente na raiz da aorta, ambas as válvulas, mitral e tricúspide estarão fechadas. Esta fase, por não existir mudança no volume de sangue intraventricular é definida como contração isovolumétrica. No momento em que a pressão intraventricular exceder a pressão da aorta, a válvula aórtica se abre, dando início a fase de ejeção ventricular. A seguir a força de contração ventricular diminui. No instante em que a pressão intraventricular cair abaixo da pressão aórtica, ocorre o

fechamento abrupto da válvula aórtica. A medida que o músculo ventricular relaxa a pressão intraventricular diminui rapidamente. Neste intervalo de tempo os valores de pressão intraventricular encontram-se abaixo da pressão da raiz da aorta, contudo, acima da pressão intraatrial. Como consequência as válvulas mitral e aórtica encontram-se fechadas, não havendo mudança no volume de sangue intraventricular. Esta fase é definida como fase de relaxamento isovolumétrico. No instante em que a pressão intraventricular cair abaixo da pressão atrial, a válvula AV se abre e dá-se início a um novo ciclo cardíaco (MOHRMAN E HELLER, 2007). Estas fases do ciclo cardíaco bem como suas características (tempo, velocidade de enchimento, velocidade de ejeção, dentre outros) podem ser analisadas mediante o emprego de ecodoplercardiografia, como mostrado na Figura 7.

Fig. 7: Representação de um registro original de ecocardiografia demonstrando o procedimento para obtenção do Volume Diastólico Final.



1.7 Potenciais de Ação Cardíacos

Os potenciais de ação são o estímulo elétrico que precede a contração das células musculares.

O potencial de ação consiste numa rápida despolarização, seguida por repolarização do sarcolema e é um fenômeno das células excitáveis, como as nervosas e as musculares. Os potenciais de ação se constituem numa das modalidades de transmissão da informação no sistema nervoso e em todos os tipos de músculos (COSTANZO, 2004).

A excitação rítmica e sincrônica do coração deve-se ao fato de que neste existem algumas células que tem a propriedade de gerarem espontaneamente potenciais de ação atuando assim como marca-passo. Isso se deve a presença de correntes de influxo de Na^+ , chamadas I_f , como o HCN2 e HCN4, e correntes de influxo de Ca^{2+} , como as $I_{\text{Ca,T}}$ (MANGONI E NARGEOT, 2008). Estes potenciais de ação se propagam de uma célula a outra, graças a baixa resistência elétrica das junções abertas presentes nos discos intercalares. A velocidade de condução, a amplitude e a duração do potencial de ação é variável, depende da espécie e da região do coração que é excitada. Em humanos, a velocidade de condução do potencial de ação nos átrios é de 0,8 a 1 m/s enquanto que no músculo ventricular (sub endocárdio) a velocidade pode alcançar 1 m/s. A maior velocidade de condução ocorre no sistema de His Purkinje onde esta alcança 2 m/s. Nas fibras do nodo átrio-ventriculares a velocidade é de 0.005 m/s (MANGONI E NARGEOT, 2008).

Os potenciais de ação da célula cardíaca são resultados de alterações transitórias da permeabilidade iônica da membrana celular. Porém os potenciais de ação das diferentes regiões do coração (ventrículos, átrios e Sistema de Purkinje), não são idênticos (MOHRMAN E HELLER, 2007), como mostrado na figura 8 que exemplifica os dois tipos

principais de potenciais de ação cardíacos: o de resposta rápida (miócitos atriais e ventriculares) e os de resposta lenta (nodo sinusal).

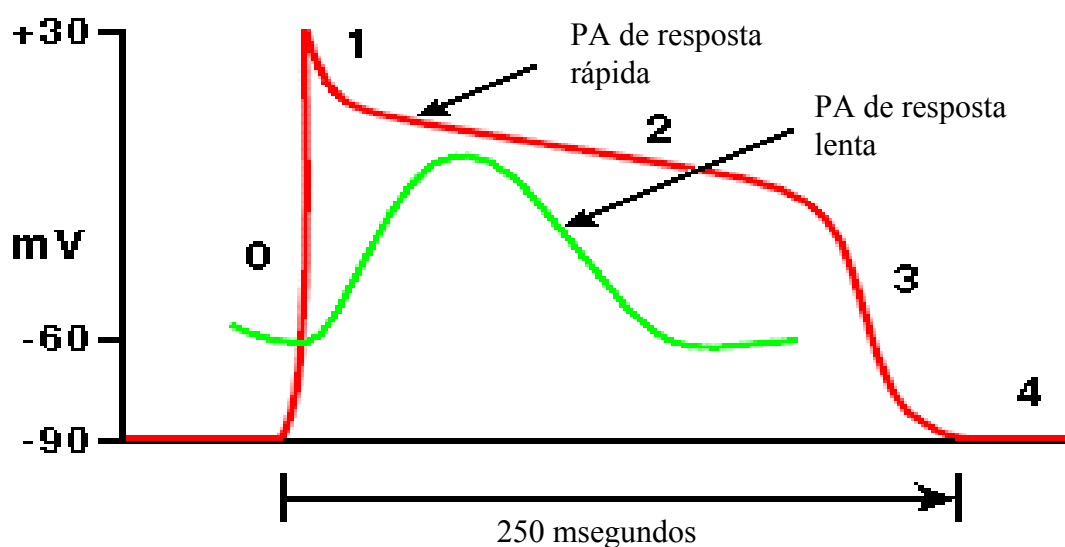
Os potenciais de ação de resposta rápida são caracterizados por cinco fases: despolarização rápida (Fase 0) a qual ocorre devido à abertura de canais rápidos de sódio, fazendo com que o potencial de membrana se aproxime do potencial de equilíbrio para o Na^+ ; repolarização transitória rápida (Fase 1), que deve-se principalmente ao efluxo de K^+ (i_{t0}) e inativação dos canais rápidos de sódio; uma fase de platô longo (Fase 2), onde o valor do potencial de ação se mantém relativamente constante, devido principalmente ao influxo de Ca^{2+} através de canais lentos de Ca^{2+} e efluxo de K^+ , através de diferentes correntes: i_{t0} , i_k e i_{k1} , a fase de repolarização (Fase 3) que ocorre como consequência da inativação dos canais de cálcio e aumento da corrente de potássio de retificação retardada (i_k), além das i_{t0} e i_{k1} e a fase 4, quando ocorre a restauração dos gradientes iônicos, por ação da Na^+K^+ ATPase, SERCA e trocador $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ (MOHRMAN E HELLER, 2007).

As células do nodo sinusal geram espontaneamente potenciais de ação, como dito anteriormente. Como a frequência de potenciais de ação gerados nestas células é maior do que em qualquer outra, o nodo sinusal se constitui no marca passo primário do coração. Os potenciais de ação de resposta lenta são caracterizados por uma fase de despolarização inicial mais lenta (ocasionada por redução da condutância ao K^+ aumento na condutância ao Na^+ , e Ca^{2+} pelas correntes já citadas) seguida por uma fase na qual a velocidade de despolarização aumenta como resultado do aumento da condutância ao cálcio através de canais lentos. O pico de voltagem alcançado é menor do que os das células de potenciais de resposta rápidas. A fase de platô mais curta e menos estável, bem como a repolarização (devido a inativação dos canais de cálcio e ao aumento na condutância ao K^+ através das correntes i_k e i_{k1}) para um valor de potencial designado como potencial diastólico máximo. Com o transcorrer do tempo

ocorre uma fase que se caracteriza por apresentar despolarização diastólica lenta (MOHRMAN E HELLER, 2007).

Portanto, como em todas as células excitáveis, os potenciais de ação da célula cardíaca resultam de alterações transitórias, principalmente na permeabilidade da membrana celular aos íons K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , que produzem as várias fases dos potenciais de ação de respostas rápida e lenta (MANGONI E NARGEOT, 2008).

Fig. 8: Representação dos dois tipos principais de potenciais de ação cardíacos, o de resposta rápida (fast type) e o de resposta lenta (slow type).



Fonte: Nosek, 1998.

Nota: Voltagem em mV; Tempo em mseg. Correntes iônicas responsáveis pelos PA de resposta rápida: $i_{Na,f}$, i_{to} , i_k , i_{kl} e $i_{Ca,s}$. Correntes iônicas responsáveis pelos PA de resposta lenta: $i_{Ca,s}$, i_k e i_{kl} .

1.8 Ações dos hormônios tireoideos sobre o sistema cardiovascular e o hipertireoidismo

A interação entre tireoide e sistema cardiovascular não é um achado científico recente. Na verdade, a influência tireoidea sobre o coração foi notada a mais de duzentos anos atrás por um médico inglês, chamado Caleb Hillier Parry (KAHALY & DILLMANN, 2005). No entanto, ainda hoje, estuda - se os mecanismos que estão por trás desta interação e as consequências que o estado hipotireoideo ou hipertireoideo pode trazer ao coração, assim como ao sistema vascular.

As ações dos hormônios tireoidianos sobre o sistema cardiovascular são mediadas diretamente sobre o coração, assim como sobre o sistema vascular (BIONDI & KLEIN, 2004). Dessa forma, as respostas da função cardíaca induzidas pelos hormônios tireoideos podem ser mediadas não só pelo efeito direto do hormônio no tecido muscular cardíaco, mas também por mudanças hemodinâmicas periféricas que levam á alterações secundárias na função cardíaca como aumento do enchimento das câmaras ventriculares e modificações contráteis. Não é claro se os efeitos ocorrem principalmente no coração ou por meio de mudanças hemodinâmicas (OJAMAA *et al.*, 1993; YEN, 2001; KAHALY & DILLMANN, 2005; AXELBAND F, *et al*, 2011).

Em relação às ações dos HT sobre o tecido cardíaco, sabe – se que são muitas e são de extrema importância para o desenvolvimento do coração e seu funcionamento. As ações sobre o músculo cardíaco podem ocorrer através da interação dos HT com receptores intracelulares, e dessa forma, alterar a expressão gênica miocitária ou através da ligação a receptores extracelulares, e dessa forma, alterar a atividade de várias proteínas miocitárias. Portanto, as ações sobre o coração são genômicas e não genômicas. Por exemplo, os HT afetam a frequência de geração bem como a duração do potencial de ação dos miócitos cardíacos através de mecanismos genômicos e não genômicos (GLOSS B, *et al*, 2001; LE

BOUTER *et al.*, 2003; AXELBEND F, *et al.*, 2011). Por outro lado, os canais hiperpolarizantes, localizados nas células marca-passo (células do nodo sinusal) têm sua transcrição regulada pelos HT (KAHALY & DILLMANN, 2005) e, portanto, são regulados por mecanismos genômicos.

Em relação às ações genômicas, segundo Gloss *et al.*, 2001 e Johansson *et al.*, 1998, existem dois tipos de receptores tireoideo expressos em corações de camundongos, chamados TR α 1, que representa cerca de 70% do total de RNAm e TR β 1, que representa 30%. Devido a maior expressão de TR α 1, este parece ser o mais importante RT no coração de camundongos. Embora não se tenha mensurado as concentrações protéicas, esses mesmos estudos utilizaram também camundongos com deleção de TR α e confirmaram que sua ação é a mais importante no coração. Esta alta expressão de TR α 1 difere de outros órgãos como fígado e rins, onde TR β é predominante.

Os camundongos em que o gene para TR α 1 foi deletado (TR $\alpha^{-/-}$), apresentaram bradicardia significativa, tamanho diminuído, hipotermia, incapacidade de reprodução e expectativa de vida diminuída. Além destas alterações, a análise da contração cardíaca identificou velocidade de contração diminuída e a força de contração dos músculos papilares diminuídas (FRAICHARD *et al.*, 1997; GAUTHIER *et al.*, 1999; FORREST & VENNSTROM, 2000). Já nos camundongos em que o gene para TR β 1 foi deletado (TR $\beta^{-/-}$), não foi encontrado prejuízo no processo de acoplamento excitação - contração cardíaco. Por outro lado, TR β 1 parece contribuir com a função cardíaca, já que a administração de T3 para camundongos TR $\alpha^{-/-}$ aumenta a frequência cardíaca, embora não a normalize, o que indica a presença de TR β 1 nas células do nodo sinusal (marcapasso cardíaco em condições normais) (WIKSTROM *et al.*, 1998) e contribuição deste para o funcionamento cardíaco normal.

É importante lembrar que, como dito anteriormente, segundo Greenspan & Strewler, 2003, o mecanismo básico e principal de ação intracelular dos hormônios tireoideos consiste

na entrada dos HT através de difusão passiva e de proteínas carreadoras específicas dependentes de energia para se ligar a receptores específicos no núcleo celular. Dentro da célula, ocorre conversão do T4 para T3 e este, liga-se ao RT (geralmente em associação com elementos reguladores tireoideos nos genes-alvo). Esta ligação geralmente libera a repressão de vários genes, e assim, inicia-se a expressão do gene.

Entre os vários genes que têm sua expressão regulada positivamente ou negativamente pelos HT, existem inúmeros genes relacionados ao processo de acoplamento excitação - contração (AEC) cardíaco que tem sua expressão aumentada por T3, como mostrado por vários estudos (OJAMAA, *et al.*, 1993; BRENT, 1994; REED *et al.*, 2000; BOUTER, *et al.*, 2003; KAHALY & DILLMANN, 2005; JIANG, *et al.*, 2006; PURTELL *et al.*, 2010). Dessa forma, T3 provoca efeitos inotrópicos (força de contração) e lusitrópicos (velocidade de relaxamento) positivos, aumentando a força de contração e relaxamento cardíaco, respectivamente. Além disso, existem alguns genes relacionados ao AEC cardíaco que possuem sua expressão diminuída pelos HT.

As proteínas relacionadas, direta ou indiretamente com o AEC cardíaco, que parecem possuir regulação positiva por T3 são: bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2), receptor rianodínico da membrana do retículo sarcoplasmático, cadeia pesada da miosina α , actina, troponina I, receptores adrenérgicos β_1 , Na/K -ATPase do sarcolema, canais lentos de Ca^{2+} do sarcolema e alguns canais de K^+ voltagem dependentes do sarcolema. As que possuem regulação negativa são: cadeia pesada da miosina β , fosfolambano, trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e adenililciclase tipos V e VI. Interessante notar que a proteína calsequestrina, importante na manutenção de uma diferença de concentração de íons Ca^{2+} entre o sarcoplasma e o retículo sarcoplasmático menor, parece não ser modulada pela tireoide (OJAMAA, *et al.*, 1993; BRENT, 1994; REED *et al.*, 2000; BOUTER, *et al.*, 2003; KAHALY & DILLMANN, 2005; JIANG, *et al.*, 2006; PURTELL *et al.*, 2010).

Quando a secreção de T3 e T4 está aumentada, como ocorre no hipertireoidismo, a expressão protéica é bastante elevada, acarretando em aumento moderado do peso do coração, que pode ser classificado como uma hipertrofia cardíaca de grau moderado. Isso ocorre porque, embora os miócitos representem apenas um terço das células do coração, eles são maiores e contém dois terços das proteínas cardíacas. As outras células que compõem o tecido cardíaco, que são os fibroblastos, são pequenos e, sintetizam as proteínas do tecido conjuntivo colágeno e elastina, que representam apenas um terço das proteínas cardíacas (KAHALY & DILLMANN, 2005).

Os aumentos na expressão de proteínas em resposta ao T3, que, de forma geral, aumenta a força de contração e a velocidade de contração e de relaxamento cardíaco, podem levar no indivíduo hipertireoideo, a hipertrofia cardíaca, assim como a menor eficiência do coração. Dessa forma, uma fração do ATP produzido, maior do que o normal, é usado para produção de calor e menor para contração, o que, a longo prazo, pode ocasionar insuficiência cardíaca (BROWN, FENNING, *et al.*, 2002; DORR, WOLFF *et al.*, 2005; HU, *et al.*, 2005; OJAMAA, 2010; DILLMANN, 2010). Em concordância, dados clínicos indicam que existe uma associação forte entre a função tireoidiana, a massa cardíaca e a hipertrofia ventricular esquerda em sujeitos com idade entre 45 e 79 anos, e que o hipertireoidismo é um fator de risco independente para a hipertrofia ventricular esquerda (DORR *et al.*, 2005).

Em relação aos efeitos não – genômicos dos hormônios tireoideos, estes também parecem influenciar a atividade cardíaca através de ações rápidas, ou seja, extracelulares. Vários trabalhos demonstraram que T3 estimula a atividade de várias proteínas miocitárias, como por exemplo, canais de Na⁺ de inativação lenta, Ca²⁺ ATPase do sarcolema, Na⁺/K⁺ATPase e SERCA2 (SEGAL, 1989; SEGAL, 1990; LIN *et al.*, 1999). Portanto, as ações intranucleares e extranucleares podem se somar. Por exemplo, estimulando a síntese e a atividade da SERCA2. No entanto, os efeitos extranucleares de T3 embora já tenham sido

demonstrados, ainda necessitam ser mais estudados e comprovados.

Da mesma maneira, já foram descritos receptores de sarcolema para os hormônios tireoidianos, porém, os sítios de ligação são de grande capacidade e baixa afinidade e, talvez, tenham a função de facilitar o transporte de T3 para dentro das células, embora a possibilidade de que tenham funções ainda não conhecidas não está descartada (AXELBAND *et al*, 2011).

As ações genômicas e não genômicas dos HT sobre o sistema vascular levam a diminuição da resistência vascular periférica (DIEKMAN *et al.*, 2001b). O estado hipertireoideo pode acarretar uma diminuição da resistência vascular periférica de até 50% (DIEKMAN *et al.*, 2001b). Em células em cultura, T3 pode acarretar relaxamento rápido da musculatura lisa. Portanto, T3 pode acarretar alterações de pressão arterial sistêmica e de débito cardíaco. Os mecanismos são multifatoriais. Entre eles inclui-se: alterações na produção de calor (DIEKMAN *et al.*, 2001b), alterações nos fluxos transmembrana de Na^+/K^+ causada por modulação nos canais retificados de K^+ (DIEKMAN *et al.*, 2001B; AXELBAND *F et al*, 2011) e relaxamento das células musculares lisas (PARK *et al.*, 1997a; PARK *et al.*, 1997b).

Por outro lado, as mudanças na resistência vascular não parecem estar relacionadas às alterações na concentração plasmática dos hormônios endoteliais adrenomedulina, que têm o efeito de causar vasodilatação, assim como não parece resultar de alterações na concentração de endotelina-1, que tem o efeito de causar vasoconstrição arteriolar. Contudo, o T3 altera a secreção do peptídeo natriurético atrial, que têm o efeito de causar vasodilatação arteriolar e, supostamente, altera o tônus adrenérgico, como explicado posteriormente. Estas alterações podem contribuir para as modificações da resistência vascular periférica total (DIEKMAN *et al.*, 2001a).

Os efeitos dos HT que diminuem a RVP decorrentes de ações não genômicas,

parecem estar relacionadas com a ativação da sintase do óxido nítrico nas células musculares lisas e/ou a atividade de canais de K^+ sensíveis a ATP (AXELBAND F *et al.*, 2011).

1.9 Eixo hipotálamo - hipófise - supra – renal

Além das ações sobre o sistema cardiovascular, ainda existe forte associação entre a atividade dos hormônios tireoideos e a atividade do sistema nervoso autonômico simpático e glândula supra – renal. Estas interações são pouco entendidas, porém, parece ser de grande importância para o esclarecimento dos mecanismos pelos quais a tireoide influencia o funcionamento cardiovascular (SAHIN *et al.*, 2005) e a homeostase corporal.

As glândulas supra – renais (também chamadas glândulas adrenais) entre outras funções, são as responsáveis por liberar os hormônios glicocorticóides em resposta ao estresse, além das catecolaminas chamadas noradrenalina e adrenalina (CINGOLANI HE E HOUSSAY AB, 2004).

O córtex adrenal sintetiza os glicocorticóides. Células corticais específicas produzem hormônios em particular, incluindo cortisol e corticosterona.

O cortisol é o principal glicocorticóide produzido pelo córtex da supra – renal em humanos, o qual contém 21 carbonos. A relação entre cortisol e corticosterona em humanos é de 7 para 1. Em contraste, em roedores, o principal glicocorticóide produzido é a corticosterona (TOUMA *et al.*, 2003).

A corticosterona, assim como o cortisol, se liga no sangue a globulina ligante de corticosteróides (CBG), porém, a ligação da corticosterona é mais fraca e sua meia – vida é de cerca de 50 minutos, comparado com 60 – 90 minutos do cortisol (TOUMA *et al.*, 2003).

Estima – se que cerca de 15% a 25% dos glicocorticóides são excretados nas fezes, devido a existência de uma circulação êntero – hepática que leva a excreção fecal destes hormônios (CINGOLANI HE E HOUSSAY AB, 2004).

Os corticosteróides estão sob controle do hormônio estimulante do córtex adrenal (ACTH) proveniente da hipófise anterior. O estresse, seja físico ou psicológico, causa um aumento rápido e acentuado na secreção de ACTH pela hipófise anterior, seguida dentro de poucos minutos por uma secreção aumentada de glicocorticóides (GREENSPAN, F. S AND STREWLER, 2003).

Os efeitos dos glicocorticóides incluem: aumento da gliconeogênese (exceto em coração e cérebro), mobilização dos ácidos graxos provenientes do tecido adiposo e antiinflamatório.

A medula supra – renal produz as catecolaminas, que possuem efeitos que mimetizam as ações da noradrenalina liberada pelas terminações pós – sinápticas do sistema nervoso autônomo. A medula supra-renal é o núcleo da glândula adrenal, e está rodeada pelo córtex adrenal (GREENSPAN, F. S AND STREWLER, 2003).

As células cromafins da medula renal são a principal fonte do corpo de catecolaminas. Para responder ao estresse, a medula supra-renal recebe a entrada do sistema nervoso simpático através de fibras pré-ganglionares originárias da medula espinhal torácica de T5-T11. Dessa forma, a medula supra-renal pode ser considerada como um gânglio simpático. Ao contrário de outros gânglios simpáticos, no entanto, a medula adrenal libera sua secreção diretamente no sangue (GREENSPAN, F. S AND STREWLER, 2003).

1.9.1 Associação entre a atividade dos hormônios tireoideos e a atividade da glândula supra – renal

Um importante achado em relação á atividade dos hormônios tireoideos e a atividade da glândula supra – renal é o fato de que agentes simpatomiméticos e estimulação da atividade tireoidiana resultam em sintomas muito parecidos, já que ambos levam a efeitos inotrópicos (força de contração), lusitrópicos (velocidade de relaxamento) e cronotrópicos (frequência cardíaca) positivos. Existem dois tipos principais de receptores adrenérgicos, os receptores α e os receptores β , cada um deles possui dois subtipos bem conhecidos, assim como um terceiro subtipo identificado recentemente (FLAMANT *et al.*, 2007). De acordo com Ratge *et al.*, (1987) e Stiles & Lefkowitz, (1981); existe a possibilidade de que a atividade tireoidiana exacerbada aumenta a sensibilidade do sistema nervoso simpático, já que os níveis de catecolaminas não se alteram durante o estado hipertireoideo e pode ser devido a um maior número de β – adrenoreceptores, porém, outros estudos realizados após estes não encontraram correlação entre o estado tireoideo e a atividade adrenérgica (HOIT *et al.*, 1997). Um estudo um pouco mais recente, no qual os níveis locais de T3 foram aumentados nos cardiomiócitos, mostrou uma diminuição dos níveis da proteína G inibitória $G_{i\alpha 3}$ e aumento da concentração de AMPc. Esta ação pode resultar em aumento da responsividade adrenérgica (CARVALHO-BIANCO *et al.*, 2004). No entanto, Bachman *et al.*, (2004), utilizaram camundongos com deleção de três receptores adrenérgicos e encontraram efeitos do estado hipertireoideo similares entre os animais com deleção dos receptores e os animais nativos. Bahouth *et al.*, (1997) e Bahouth *et al.*, (2011), mostraram que o gene do receptor adrenérgico $\beta 1$ (mais abundante em cardiomiócitos da maioria das espécies) parece ser sensível a T3. Por outro lado, o gene do receptor $\beta 2$ parece ser pouco sensível a T3. Portanto, embora pareça existir alguma interação entre o estado tireoideo e o sistema nervoso simpático, mesmo este tópico havendo sido foco de pesquisas durante muitos anos, esta relação ainda é obscura.

Considerando – se a importância de ambos para um perfeito funcionamento de todo o organismo, novos e amplos estudos são necessários para clarificar a relação entre estes dois sistemas para a manutenção da homeostasia.

Existem vários trabalhos que relacionam hipertrofia ventricular esquerda e hiperatividade simpática. Inicialmente pensava-se que o aumento da atividade simpática fosse um mecanismo compensatório da hipertrofia ventricular esquerda, porém, logo constatou - se que é uma resposta adversa que contribui para disfunção ventricular esquerda, insuficiência cardíaca e morte (PERLINI, 2006). Segundo Lin *et al.*, (2006), β – bloqueadores são amplamente utilizados para diminuir a progressão de hipertrofia ventricular esquerda, porém, tem sido observado que o desenvolvimento de fibrose intersticial não diminui com o uso de β – bloqueadores. Este achado levou alguns pesquisadores a estudar o papel do receptor adrenérgico α . Este receptor ainda não se tornou um recurso terapêutico devido a um estudo clínico que não encontrou eficácia em seu bloqueio. O receptor adrenérgico $\alpha 1$ está envolvido com o desenvolvimento de fibrose intersticial e, portanto, o seu bloqueio pode diminuir a deposição de colágeno no tecido cardíaco e, em consequência, a fibrose (PERLINI *et al.*, 2005; 2006). Dessa forma, graças ao emprego de bloqueadores específicos para cada subtipo de receptor, estes estudos demonstraram papéis diferentes para cada um, sendo os receptores adrenérgicos $\beta 1$ e $\beta 2$, principalmente envolvidos com o desenvolvimento de hipertrofia e o receptor adrenérgico $\alpha 1$ envolvido com o desenvolvimento de fibrose intersticial (embora o envolvimento com hipertrofia não seja descartado). É importante ressaltar que, o receptor adrenérgico $\beta 3$, identificado a alguns anos, tem sua síntese aumentada durante vários processos cardíacos patológicos, acarretando efeitos opostos aos dos $\beta 1$ e $\beta 2$, e portanto, sendo considerado como um fator de segurança durante estimulação adrenérgica intensa (FLAMANT *et al.*, 2007). Portanto, tanto bloqueadores $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\beta 2$ adrenérgicos, quanto agonistas de receptor $\beta 3$ adrenérgicos, podem ser recursos terapêuticos importantes para

combater a progressão de hipertrofia cardíaca que ocorre no hipertireoidismo.

De maneira similar, a atividade tireoidea aumentada têm sido associada a concentrações aumentadas de cortisol (em humanos) e corticosterona (em roedores) (JOHNSON, *et. al*, 2005), embora existam muito poucos estudos experimentais e clínicos que comprovem esta relação. Segundo Greenspan & Strewler (2000), de fato, a tireotoxicose, a qual é uma síndrome resultante da exposição a concentrações elevadas de hormônios tireoideos em humanos possui sintomas similares à resposta ao estresse e é, portanto altamente relacionada a uma suposta hiperatividade adrenal em resposta a níveis altos de hormônios tireoideos (JOHNSON *et. al*, 2005). Clinicamente, pacientes com hipertireoidismo necessitam de receber doses altas de cortisol devido ao catabolismo mais rápido, indicando uma diminuição da reserva adrenal (LIZCANO F E J SALVADOR, 2008). Apesar dos HT supostamente interagirem com o eixo hipotálamo hipófise supra – renal e aumentar as concentrações de glicocorticóides, mais estudos são necessários para comprovar esta interação em modelos humanos e animais (TSATSOULIS *et al*, 2000; JOHNSON E *et al*, 2005; LIZCANO F. E J. SALVADOR, 2008). Além disso, não há estudos suficientes sobre o papel da TH e as conseqüências de hipertireoidismo (Hy) no eixo hipotálamo hipófise supra – renal.

Achados que fortalecem esta visão clínica baseiam – se na mensuração das concentrações plasmáticas totais de corticosteronas plasmáticas, as quais encontram - se elevadas na tireotoxicose (TSATSOULIS *et al.*, 2000; KAMILARIS *et al.*, 1991; HARVARD *et al.*, 1970).

2 JUSTIFICATIVA

O funcionamento da glândula tireoide tem profundo impacto na homeostasia corporal. As funções gerais do organismo dependem de adequada regulação metabólica pelos hormônios tireoidianos. Entre os diferentes sistemas fisiológicos, o sistema cardiovascular é um dos que recebe maior influência da glândula tireoidiana, portanto, quaisquer disfunções desta, acarretam consequências amplas na função cardiovascular. Este dado foi notado desde as primeiras descrições de hipertireoidismo desde duzentos anos atrás (KAHALY, 2002). Os efeitos são mediados de forma direta, sobre o coração, ou indireta, sobre o sistema vascular (GRAETTINGER, 1959; BIONDI, 2002).

Muitos estudos correlacionam o funcionamento tireoidiano e o cardiovascular (BACHMAN *et al.*, 2004; BIONDI & KLEIN, 2004; BRENT, 1994; DORR *et al.*, 2005; FLAMANT *et al.*, 2007; FORREST & VENNSTROM, 2000; GREENSPAN, 1997; KAHALY & DILLMANN, 2005; OJAMAA *et al.*, 1993; SEGAL, 1989). No entanto, ainda não é claro como a tireoide influencia o funcionamento cardiovascular, especialmente em vigência de patologias presentes na glândula que resultem em hipertireoidismo. Além disso, sabe-se que, a presença de hipertireoidismo leva também a disfunções do sistema nervoso autônomo (SNA) e a concentrações aumentadas de glicocorticóides, porém, a interação entre glândula tireoide e glândula supra – renal ainda é obscura (STILES & LEFKOWITZ, 1981; STILES & LEFKOWITZ, 1980; KAHALY & DILLMANN, 2005; GREENSPAN, 1997; FLAMANT *et al.*, 2007; BRENT, 1994).

Os genes relacionados ao acoplamento – excitação - contração (AEC) do coração são os principais alvos para os TH, resultando em efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos. No hipertireoidismo tem sido encontrado aumento no desempenho cardíaco, seguido de, a longo prazo, diminuição na eficiência cardíaca, além de alteração na resistência vascular

periférica total (RVPT) e uma possível hiperatividade da glândula supra – renal. No entanto, poucos estudos fisiológicos têm sido realizados em modelo animal, tanto *in vivo* como *in vitro* para investigar as conseqüências do hipertireoidismo no coração, na pressão arterial e na secreção de corticosterona pela glândula supra - renal.

Dessa forma, o entendimento dos mecanismos de ação dos hormônios tireoidianos, quando em excesso, é necessário tanto ao entendimento básico da fisiopatologia do hipertireoidismo quanto no manejo terapêutico e profilaxia da doença cardiovascular nestes pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos do hipertireoidismo no desempenho do músculo cardíaco “*in vivo*” e “*in vitro*”, na pressão arterial e nos níveis de corticosterona fecal em modelo experimental (ratos Wistar).

3.2 Específicos

Em animais eutireoideos e em animais hipertireoideos os objetivos específicos foram:

- 1) Determinar as concentrações séricas de T3 e T4.
- 2) Determinar os níveis de corticosterona fecal no primeiro, quinto e décimo dia de tratamento.
- 3) Analisar possíveis alterações rítmicas eletrocardiográficas
- 4) Avaliar, através de ecocardiografia, possíveis alterações em parâmetros de rendimento cardíaco (Fração de Ejeção, Volume Sistólico, Volume Diastólico Final, Débito Sistólico, Índice de TEI, Tempo Diastólico Total, tempo de relaxamento isovolumétrico e tempo de contração isovolumétrica).
- 5) Aferir os níveis de pressão arterial sistólica e diastólica.
- 6) Avaliar, em músculos papilares, parâmetros de contratilidade (velocidade máxima de produção de força (+dF/dT) e de relaxamento (-dF/dT) em condição isométrica, força máxima, sensibilidade ao Cálcio e potenciação pós - pausa).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Em condições de laboratório, foram utilizados ratos machos Wistar ($n \geq 8$ para cada grupo), pesando entre 250 g e 300 g, fornecidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Após adaptação as condições de laboratório, os animais foram divididos randomicamente em 2 grupos: um grupo composto por animais tratados com injeções diárias *i.p.* de hormônio tireoidiano (T3 - 150 $\mu\text{g/kg}$) (Sigma Aldrich Chemicals, St. Louis, MO) durante dez dias (Grupo Hipertireoideo - GH), (BACHMAN *et al.*, 2004) e um grupo controle – GC (eutireoideo) tratados com injeções diárias de solução salina durante dez dias. Cada animal foi mantido em uma caixa e sob ciclo de 12 horas claro/escuro.

Os procedimentos utilizados nesta pesquisa foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Embora a dose de 150 $\mu\text{g/kg}$ tenha sido mostrada previamente como suficiente para causar aumento significativo das concentrações circulantes de T3 (BACHMAN *et al.* 2004), as concentrações dos hormônios tireoideos séricos dos grupos controle (eutiroideo) e do grupos experimental foram determinados pelo IMMULITE 2000 Analyser Total T4, T3 – imunoensaio competitivo de fase sólida, de enzimas químico-luminosas realizado no laboratório de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

4.1 Avaliação da função cardíaca através da ecocardiografia

Animais do grupo hipertireoideo e do grupo controle - eutireoideo foram submetidos a anestesia geral com 10 mg/kg de ketamina – Fort Dodge; Iowa, USA e 50 mg/kg of xilasina – Bayer; Germany, *i.p.*, e após a tricotomia foram analisados com equipamento de ecocardiografia bidimensional modelo Sonos 5500 (Hewlet Packard, USA), com transdutores

setorial S12 (5-12 mHz) e limiar 15L6 (7-15mHz) e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE) era medida na posição para - esternal longitudinal, de acordo com o método de Simpson,. Este procedimento foi realizado pelo Prof Dr Nelson Itiro Miyague, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Laboratório de Técnica Operatória.

Os seguintes parâmetros foram utilizados:

Área sistólica (cm^2), volume diastólico final (ml) área sistólica final (cm^2) e volume sistólico final (ml): os volumes foram mensurados pelo método de Simpson que calcula o volume da cavidade do ventrículo esquerdo considerando que ela seja formada por diversos segmentos com espessura e área transversa conhecidas. O volume da cavidade foi calculado através da soma dos diversos volumes dos segmentos. Conhecendo-se o volume diastólico e o volume sistólico do ventrículo esquerdo, pelo método de Simpson (Wyatt, 1980), é possível saber o volume de ejeção e a fração de ejeção.

Fração de ejeção (FE): obtida dividindo-se o volume de ejeção pelo volume diastólico final. Em seguida, multiplica-se por 100.

Onda E: o fluxo mitral normal apresenta dois picos durante a diastóle. O primeiro pico mostra a velocidade do fluxo protodiástole, durante a fase de enchimento rápido e passivo do ventrículo esquerdo que ocorre após a abertura da valva. Este pico é chamado Onda E.

Onda A: o segundo pico é telediastólico e corresponde ao aumento da velocidade de fluxo após a contração atrial esquerda, sendo chamado de Onda A.

Tempo sistólico (s): intervalo de tempo mensurado à partir do fechamento da válvula mitral até a abertura da válvula aórtica.

Tempo diastólico(s): o tempo diastólico total foi mensurado como o intervalo de tempo transcorrido a partir do fechamento da válvula aórtica até o fechamento da válvula mitral. Subtraindo-se deste intervalo de tempo, o tempo transcorrido a partir do fechamento

da válvula aórtica á abertura da válvula mitral é o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV).

Frequência cardíaca: foi calculada como o inverso do período transcorrido entre os picos do complexo QRS.

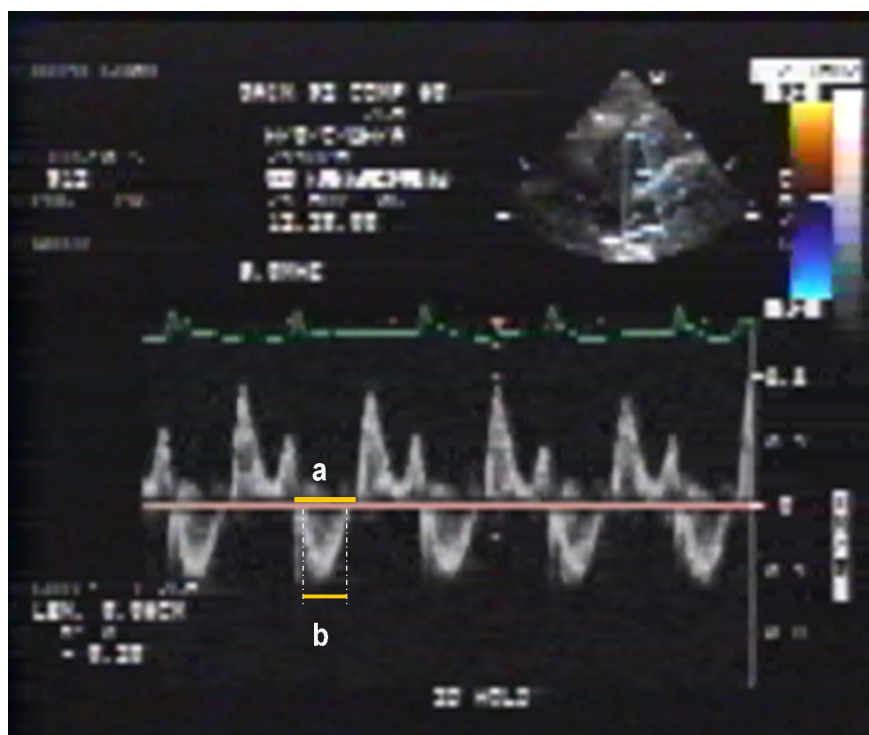
TRIV: Tempo de relaxamento isovolumétrico(s) – como já dito, corresponde ao intervalo de tempo entre o fechamento da valva aórtica e abertura da valva mitral, sendo um indicador da distensibilidade do ventrículo esquerdo.

Variável A: Obtido através da soma do Tempo sistólico mais o TRIV.

Índice de TEI: tempo de contração isovolumétrico somado ao tempo de relaxamento isovolumétrico dividido pelo tempo de ejeção. O índice de Tei (Tei *et al.*, 1997) é obtido subtraindo-se do intervalo de tempo transcorrido entre o fechamento da válvula mitral até a sua abertura, o tempo de ejeção (intervalo de tempo transcorrido a partir da abertura da válvula aórtica até o seu fechamento) e o resultado dividido pelo tempo de ejeção ventricular. Este índice é, portanto, útil, já que existe correlação entre os tempos de contração e de relaxamento isovolumétricos com os valores máximos de pressão intraventricular medidas nestas duas fases do ciclo cardíaco com o emprego de métodos diretos (transdutores de pressão). Assim, um aumento nos valores deste índice demonstra, indiretamente, comprometimento ventricular global (sistólico e/ou diastólico) (TEI, 1997 395 /id).

A figura 09 mostra um exemplo de ecocardiografia realizada em animal do grupo controle.

Figura 9: Registro ecocardiográfico realizado em animal do grupo controle, mostrando os locais delimitados para o cálculo do índice de Tei.



Nota: Índice de Tei = $a - b/b$, sendo a, a soma do TRIV mais TE mais TCIV e b, o TE.

4.2 Avaliação da atividade elétrica do coração mediante eletrocardiografia

Animais do grupo hipertireoideo e do grupo controle – eutireoideo, após 24 horas depois da ecocardiografia, eram anestesiados como descrito acima e previamente aos experimentos de mensuração das pressões arteriais e de músculo papilar isolado, eram submetidos ao registro eletrocardiográfico utilizando eletrocardiógrafo Mikromed ER 661 (Hungria), realizado nas derivações convencionais DI, DII, DIII, AVR e AVL.

4.3 Pressão arterial, relação peso do coração/peso corporal, relação peso da glândula supra – renal/peso corporal e mensurações contráteis através da utilização de músculos papilares

Os ratos eram heparinizados (500 UI, i.p.) e anestesiados com 70 mg/kg de ketamina – Fort Dodge; Iowa, USA e 10 mg/kg of xilasina – Bayer; Germany, *i.p.*. Após 30 minutos, realizava-se a tricotomia e os animais eram colocados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica. Após a verificação de falta de resposta a estímulo doloroso na raiz da cauda e nas orelhas, era iniciado o procedimento.

Inicialmente, foi feita uma incisão da pele na linha média na região do pescoço até o tórax do animal. Em seguida retirou-se a pele para expor os músculos esternocleidomastoideos. Com auxílio de uma pinça realizou-se a dissecação dos músculos até encontrar a artéria carótida junto com nervo vago. A seguir isolou-se a artéria do nervo, e tracionando-a com 2 linhas posicionadas distal e cefalicamente, fez - se um nó na linha colocada próxima a cabeça com intuito de obstruir o fluxo sanguíneo. A porção distal da linha foi então tracionada com uma pinça hemostática para facilitar o acesso. Com uma tesoura oftalmológica realizou - se uma secção parcial da artéria em um ângulo de 45 graus para facilitar a introdução do cateter. Após a introdução do cateter (Angiocath 22GAX1.00 IN(0,9 x 25 mm) BD ®, de aproximadamente 1cm na artéria, o mesmo foi fixado com a linha distal. O catéter foi acoplado a um transdutor de pressão conectado a um polígrafo para registro. O sinal também foi digitalizado mediante um conversor Analógico-Digital-Digital Analógico (DATA TRANSLATION- AT 2801-A). Aguardou -se a estabilização dos níveis de pressão arterial por um tempo de aproximadamente 30 minutos. A calibração prévia do transdutor foi realizada antes de iniciar o registro da pressão arterial em todos os experimentos. Após a coleta dos dados, desconectou - se a cânula do transdutor de pressão (NARCO

BioSystem, Houston, Texas) e procedeu-se a colheita de sangue arterial através do cateter, o qual foi acondicionado no frasco VACUETTE. Estes foram identificados, e posteriormente centrifugados e, em seguida, encaminhados ao laboratório para dosagem hormonal.

Após estes procedimentos foi realizada a toracotomia. Os corações foram removidos rapidamente e colocados em um copo de Becker de 5 ml contendo solução de THYRODE composição em (mM), NaCl=136,0; KCl=5,0; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ =0,98; $CaCl_2$ =2,0; NaH_2PO_4 =0,36; $NaHCO_3$ =11,9; e Glicose=5,5, com pH=7,4, assim como a glândula supra – renal direita e pesados para cálculo da relação peso do coração/peso corporal em mg/g, (índice de hipertrofia) e relação peso da glândula supra – renal/peso corporal.

Rapidamente o coração foi colocado em uma placa com solução de THYRODE e perfundidos através do coto aórtico para permitir uma adequada seleção e dissecação dos músculos papilares do ventrículo esquerdo. A solução foi continuamente gaseificada com mistura carbogênica contendo 95% de O_2 e 5% de CO_2 , para manutenção do pH estável em 7,4.

O coração foi fixado na placa de Petri e iniciada a secção do músculo no sentido longitudinal na linha média desde o ápice até aos átrios (linha interventricular), para exposição das câmaras esquerda e direita. Com uma pinça fixou-se a extremidade tendínea do papilar, para facilitar a dissecação da extremidade que se encontra inserida na parede ventricular.

O músculo papilar foi transferido para uma câmara de 5 ml, tendo uma das extremidades presa a um transdutor de força (Fort-10, Transduction Laboratories Co.), e a outra extremidade presa a um gancho acoplado a um pequeno motor (Muscle Lever System Motor, Aurora Scientific Inc.) que serve para manipular o comprimento do músculo, permitindo variações de comprimento na escala de micrômetros (μm).

Os músculos foram estirados até Lmax (comprimento do músculo no qual a tensão ativa é máxima) e estimulados por pulsos de voltagem (10 a 15 V) duração no máximo de cinco msec, através de um par de eletrodos de platina posicionados ao longo de toda a extensão do músculo. A frequência de estimulação padrão foi de 0,5 Hz. As preparações foram mantidas por um período de estabilização de 60 minutos e, em seguida, realizou - se os protocolos experimentais. A força desenvolvida (F) foi medida por meio de transdutor de força isométrica (NARCO BioSystem, Houston, Texas) e registrada em polígrafo Lafayette Instrument Company, Indiana, USA.

Foram analisados os seguintes parâmetros: pico de força isométrica (F), tempo de ativação (TA), tempo de relaxamento (TR) e potenciação pós – pausa (PPP) da contração isométrica obtida após as pausas de 1, 3, 5, 10 e 20 segundos. A PPP mostra a potenciação da contração após um período durante o qual a estimulação elétrica é interrompida.

Para o cálculo do tempo de ativação e do tempo de relaxamento, era traçada uma linha na base do registro e uma linha vertical através do pico do registro. Em seguida, procedia - se a contagem dos milímetros desde a intercessão destas linhas à esquerda, (TA) e à direita (TR) até o encontro com a linha de registro. Uma vez obtido os valores em milímetros este eram, de acordo com a velocidade do papel, transformados em ms. A potenciação relativa foi considerada como razão entre a amplitude da contração antes da pausa.

A exceção da potenciação relativa cujos valores são relativos, a calibração do papel foi realizada nos registros de análise e em conformidade com a velocidade do papel.

Com a finalidade de avaliar um efeito do excesso dos hormônios T3, T4 sobre as intervenções inotrópicas, após período de estabilização, avaliamos a dependência do desenvolvimento da força de contração isométrica (F) dos músculos papilares, e as alterações da concentração extracelular de cálcio (Ca^{2+}) (0,5; 1; 2; 3; 5; 10 mM).

4.4 Avaliação da influência do hipertireoidismo na concentração de corticosterona fecal

A fim de monitorar de forma não - invasiva a influência do hipertireoidismo na atividade adrenocortical, a medição da concentração de corticosterona fecal (CF) foi feita conforme descrito por Young KM et al, 2004. As amostras de fezes de 24 horas dos dois grupos de animais foram coletadas no dia primeiro, quinto e décimo do tratamento e armazenadas a -20° C. Além disso, a relação peso da glândula supra-renal/peso corporal foi usada para combinar as análises de dados.

4.5 Análise estatística

Duas amostras foram comparadas utilizando-se o teste t de Student. Para comparações múltiplas foi utilizado o one-way análise de variância (ANOVA) por meio do programa SigmaPlot. Quando ANOVA mostrou diferença significativa, este foi seguido pelo pós – teste Tukey. Para amostras repetidas foi utilizado o pós – teste Bonferoni. Os dados foram expressos como média \pm SE, de pelo menos 8 de observações. Para análise dos dados foram utilizados os programas Sigma Plot versão 9.0 e Sigma Stat versão 2.0, fabricados pela Jandel Scientific Inc. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade de ocorrência da hipótese nula foi $\leq 0,05$ ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Concentrações hormonais basais

Comparado com o grupo controle, as concentrações séricas de T4 diminuíram ligeiramente no grupo tratado com T3: $2,54 \pm 0,4$ g / dL e $2,1 \pm 0,47$ mg / dL, respectivamente, como seria de se esperar devido ao feedback negativo de T3 sobre o eixo hipotálamo - hipófise - tireoide. As concentrações séricas de T3 foram significativamente aumentadas no grupo tratado com T3 ($p \leq 0,05$): $35 \pm 11,3$ ng / dL e $103 \pm 16,4$ ng / dL, respectivamente, portanto confirmando que o tratamento T3 foi eficiente na indução de hipertireoidismo.

5.2 Influências do hipertireoidismo na concentração de corticosterona fecal

Não houve diferença estatisticamente significativa na relação peso da glândula supra-renal / peso corporal (mg / g) ($p \geq 0,05$). Os valores relação peso da glândula supra-renal peso / peso corporal (\pm SE) no grupo controle foram $0,091 \pm 0,01$ e $0,1 \pm 0,013$ no grupo hipertireoideo. Em contrapartida, houve uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de corticosterona fecal no quinto dia de tratamento, embora esta diferença não tenha sido mantida no décimo dia de tratamento, quando os experimentos foram realizados, como mostrado na tabela 1.

Tabela 01: Corticosterona fecal de animais do grupo controle e grupo hipertireoideo (n = 8).

GC 1	GH 1	GC 5	GH 5*	GC 10	GH 10
273,19 ± 62,73	317,32 ± 48,96	272,94 ± 30,83	613,54 ± 104,74	305,82 ± 65,79	361,27 ± 65,99

NOTA: Os valores estão mostrados como média ± SE. * P <0,05 comparado aos animais do grupo controle. Concentração, em ng / g de fezes. 1: 1º dia da injeção; 5: 5º dia da injeção; 10: dia 10º de injeção.

5.3 Ecocardiografia

Dados de Ecocardiografia são mostrados nas tabelas 2 e 3. Comparado com o grupo controle, o grupo hipertireoideo mostrou redução do volume sistólico final (VSF), volume diastólico final (VDF), Tempo diastólico total (TDT), tempo de ejeção (TE), Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), Área diastólica (Área Diast.) , área sistólica (Área Syst.), variável A (VA) e relação E / A (p <0,05). Frequência cardíaca (FC), fração de ejeção (FE) e débito cardíaco (DC) foram aumentados (p <0,05). Não houve alteração entre os grupos no tempo de contração isovolumétrica (TCIV), débito sistólico (DS), índice de Tei e tempo de desaceleração da onda E (TDOE) (p ≥ 0,05). A relação VDF / peso corporal não foi diferente entre os grupos (GC: 0,002 mL/g ± 0,0001 e GH: 0,0018 mL/g ± 0,0001) e o trabalho sistólico foi maior no grupo hipertireoideo (GC: 33,792 mL / mmHg ± 1,11 e GH: 38,11 mL / mmHg ± 1,36).

Tabelas 2 e 3: Valores de rendimento cardíaco de animais do grupo controle e hipertireoideo obtidos através de ecocardiografia (n = 8).

	VSF*	VDF*	TRIV*	TCIV	TDT*	FC*	TE*	FE*
GC (n=8)	0.19 ± 0.01	0.52 ± 0.02	27 ± 0.006	16 ± 0.002	130 ± 0.01	270 ± 14	84 ± 0.001	63 ± 0.5
GH (n=8)	0.12 ± 0.01	0.43 ± 0.02	18 ± 0.002	15 ± 0.001	100 ± 0.004	380 ± 9.2	59 ± 0.001	72 ± 1.2

	DS	DC*	VA*	TDOE	Area Diast.*	Area Syst.*	Índice de Tei	E/A*
GC (n=8)	0.33 ± 0.01	89 ± 7.98	127 ± 0.002	45 ± 0.002	0.99 ± 0.014	0.54 ± 0.01	0.5 ± 0.03	1.9 ± 0.24
GH (n=8)	0.31 ± 0.02	118 ± 6.82	92 ± 0.002	43 ± 0.002	0.9 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.54 ± 0.02	1.57 ± 0.35

NOTA: Os valores estão mostrados como média ± SE. * P < 0,05 comparado ao grupo controle. Tempo, em msec.; Volume, em mL. VSF: volume sistólico final; VDF: volume diastólico final; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TCIV: tempo de contração isovolumétrica; TDT: tempo diastólico total; FC: frequência cardíaca; FE: fração de ejeção; DS: débito sistólico; DC: débito cardíaco; Área diast.: área diastólica; Área Syst.: área sistólica; TE: tempo de ejeção; VA: Variável A; TDOE: tempo de desaceleração da onda E, E / A: razão entre a onda E e a onda A.

5.4 Avaliação da atividade elétrica do coração mediante eletrocardiografia

Os resultados das análises eletrocardiográficas mostraram que não houve fibrilação atrial ou fibrilação ventricular, assim como não foi detectado extras – sístoles ou quaisquer outras alterações de ritmo cardíaco em nenhum dos animais dos GC e GH. No entanto, foi detectado taquicardia com ritmo sinusal no GH. A FC medida durante eletrocardiografia em animais do GC foi 224 ± 21 e do GH foi 330 ± 29 batimentos por minuto (b.p.m.).

As figuras 10 e 11 mostram um exemplo de exame eletrocardiográfico de animal controle (fig. 10) e de um animal hipertireoideo (fig. 11).

Fig. 10: Registro eletrocardiográfico realizado animal do grupo controle. Velocidade do papel: 50 mm/s. Derivações (em ordem descendente): D1, D2, D3, aVR e aVL.

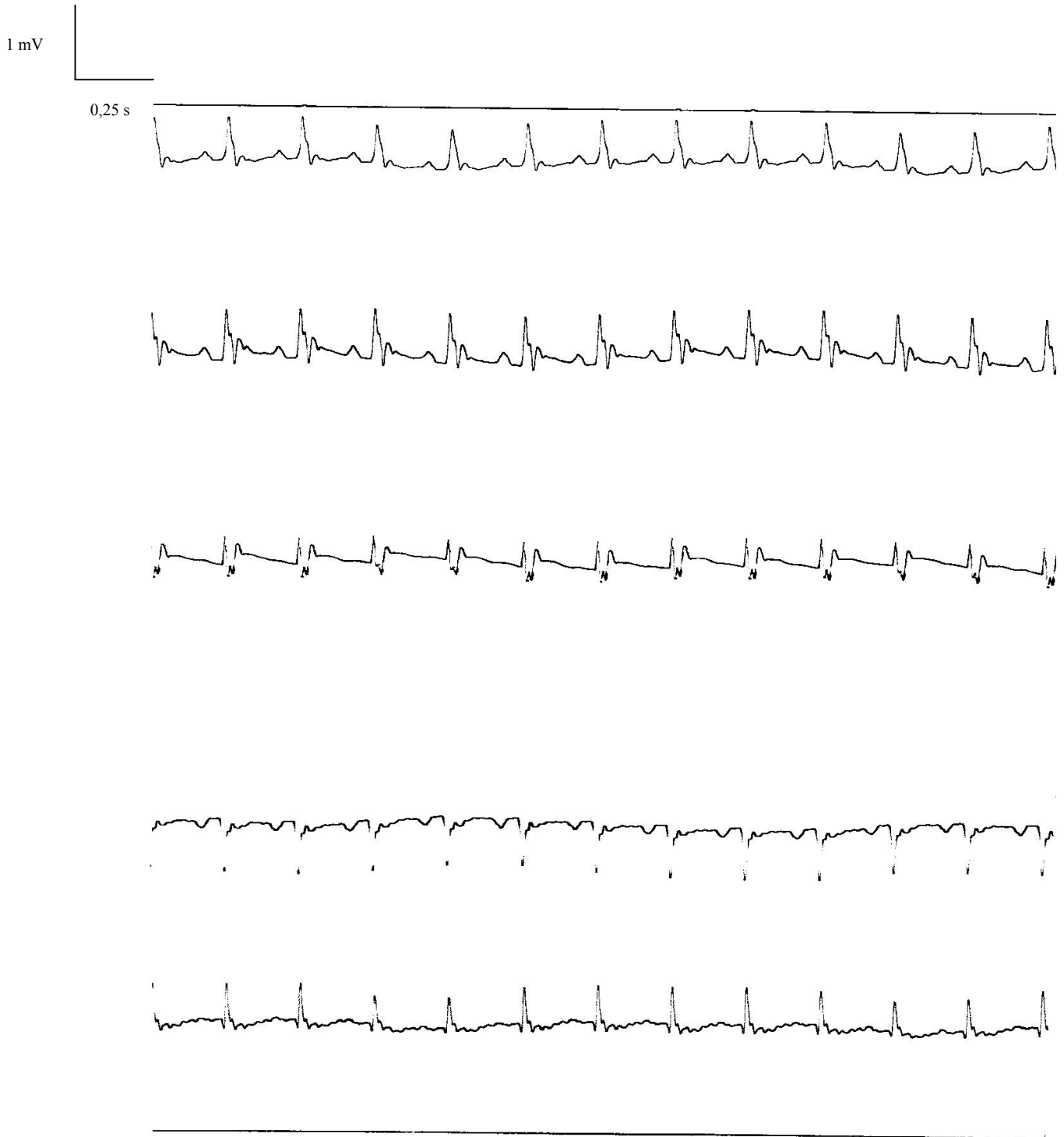
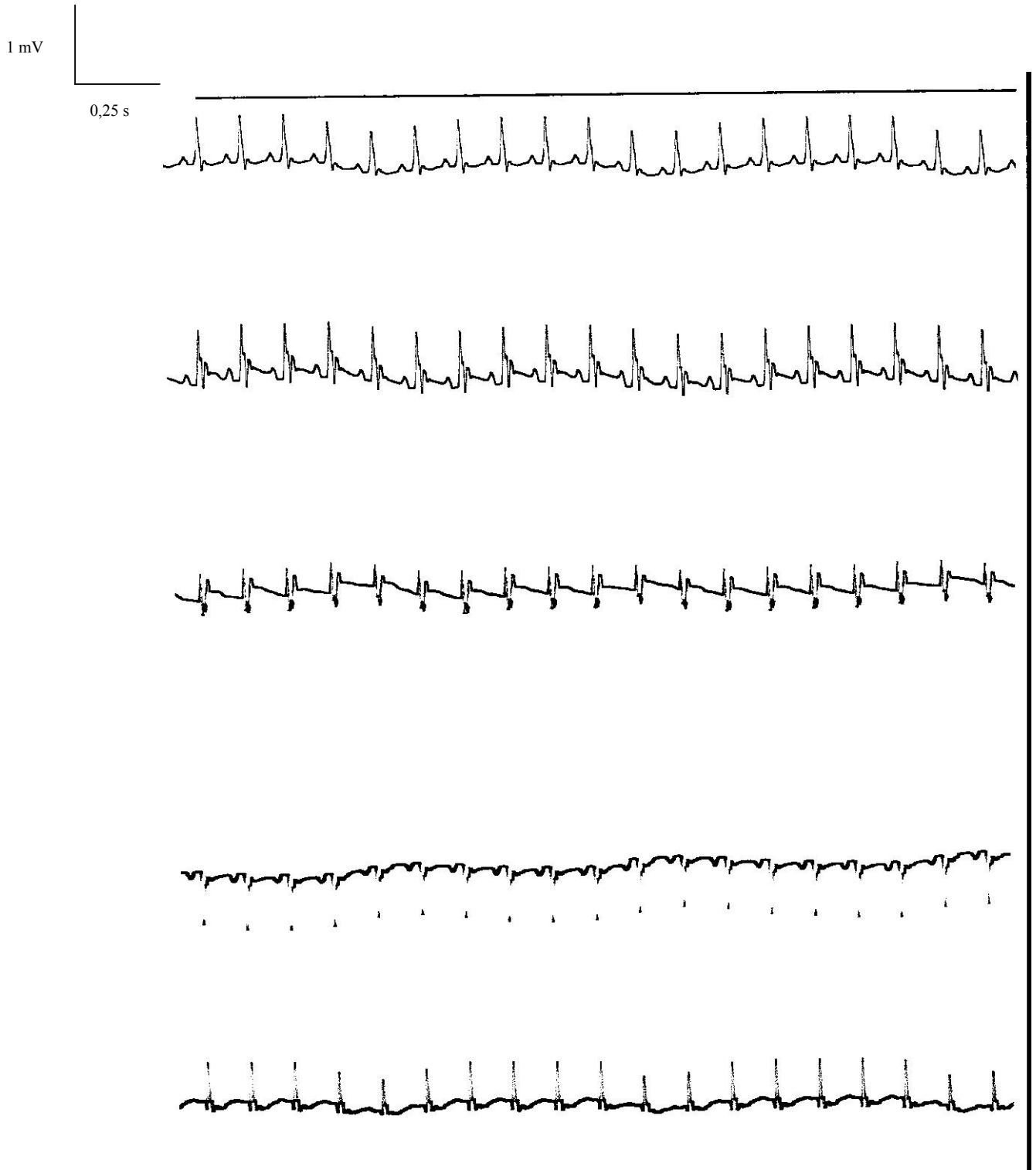


Fig. 11: Registro realizado em animal do grupo hipertireoideo. Velocidade do papel: 50 mm/s. Derivações (em ordem descendente): D1, D2, D3, aVR e aVL.



5.5 Pressão arterial, peso do coração / peso corporal, peso da supra-renal / peso corporal e medidas de contração de músculo papilar

PAS foram maiores no HG ($p \leq 0,05$). PAS, PAD e Pressão Arterial média (PAM) (\pm SE, em mmHg) obtidos no controle foram, respectivamente 112 ± 14 ; $97,6 \pm 11$ e $102,4 \pm 12$, enquanto nos ratos com hipertireoidismo foram, respectivamente, $135,4 \pm 15,0$; $116,7 \pm 19$ e $122,93 \pm 16,5$.

A RVPT (mm Hg/mL/min) não foi diferente entre os grupos. Os valores obtidos no GC foram: $1,15 \pm 0,1$ e no GH foram: $1,04 \pm 0,09$ ($p \geq 0,05$).

A relação Peso do coração / peso corporal (mg / g) foi maior no GH ($p \leq 0,05$). Os valores de peso do coração / peso corporal (\pm SE) no GC foram de $3,3 \pm 0,16$ e $5,1 \pm 0,36$ no GH.

A área de seção transversa dos papilares dos grupos controle e hipertireoideo foram, respectivamente, $0,42 \pm 0,16$ e $1,05 \pm 0,6$ mm². Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na força de contração máxima (mN/mm²) (GC: $62 \pm 28,7$; GH: $56,3 \pm 22,1$) e na potenciação pós pausa (PPP) da contração isométrica em quaisquer das concentrações de cálcio extracelular utilizado (1, 3, 5, 10 e 20 segundos).

As figuras 12 a 16 mostram registros originais de um experimento típico obtido com papilar isolado eletricamente estimulado do GC na $[Ca^{2+}]$ de 2 mM, em condições basais e em diferentes PPP.

A PPP de músculos papilares isolados de ambos os grupos na concentração extracelular de cálcio de 0,5, 1, 2, 3, 5, e 10 mM estão mostradas nos gráficos 1 a 6. A força de contração máxima (mN/mm²) de ambos os grupos na concentração extracelular de cálcio de 0,5, 1, 2, 3, 5, e 10 mM está mostrada no gráfico 7.

Fig. 12: Registro original de um experimento típico obtido com papilar isolado eletricamente estimulado do GC. $[Ca^{2+}] = 2$ mM.

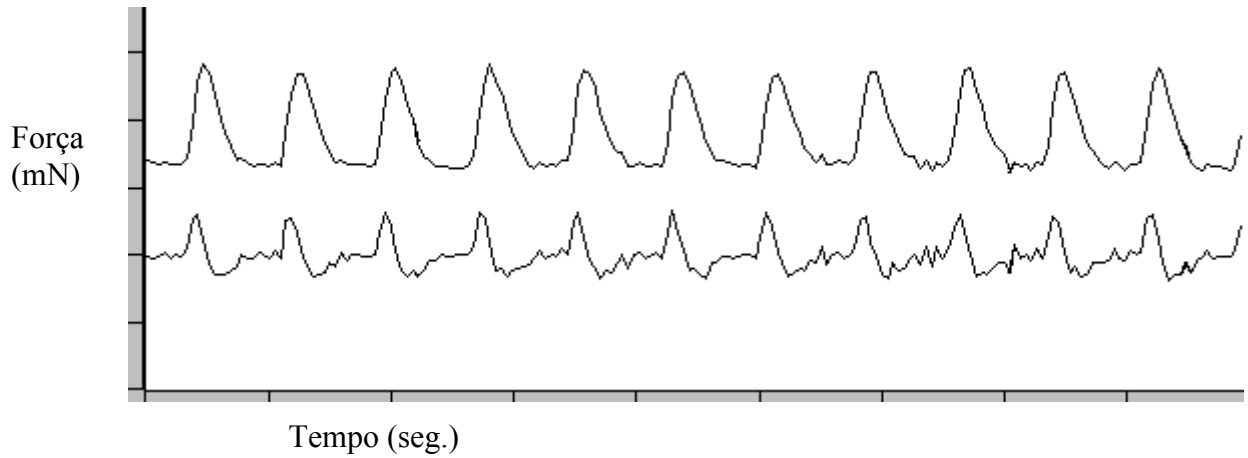


Fig. 13: Registro original de PPP de 1 seg. em papilar isolado eletricamente estimulado do GC. $[Ca^{2+}] = 2$ mM. Note o período de pausa de 1 seg após a seta.

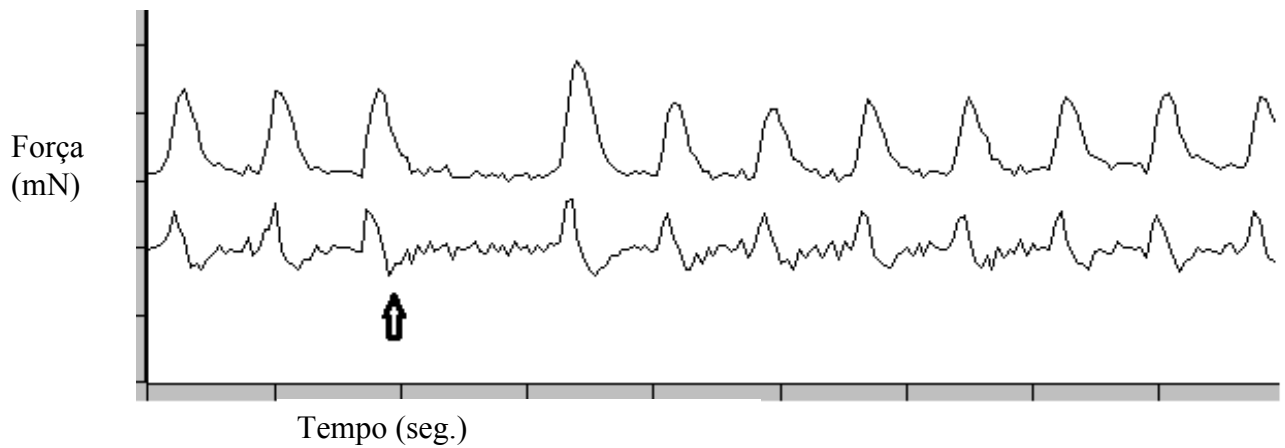


Fig. 14: registro original de PPP de 3 seg. em papilar isolado eletricamente estimulado do GC. $[Ca^{2+}] = 2$ mM. Note o período de pausa de 3 seg após a seta.

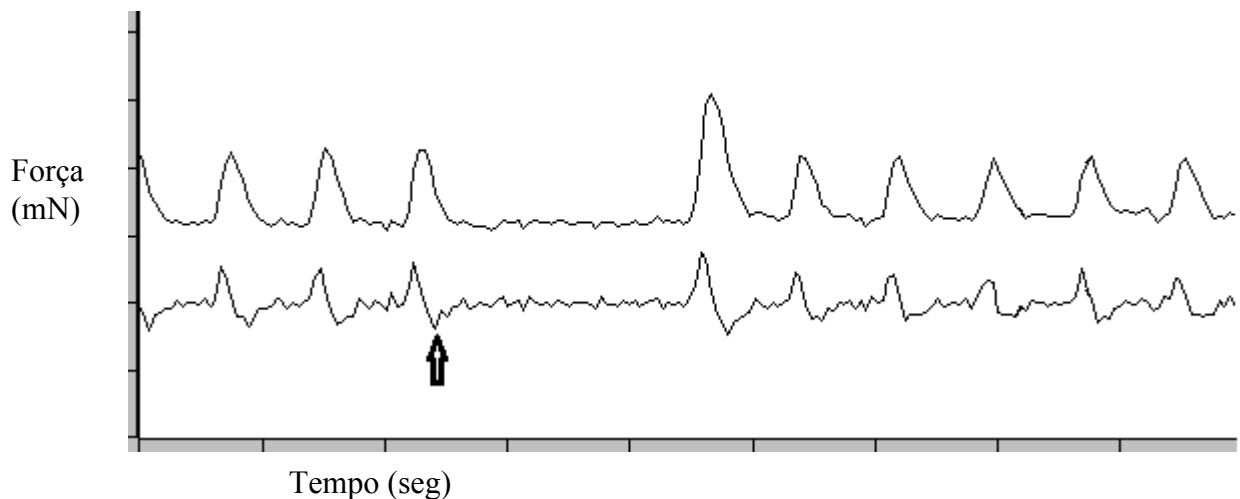


Fig. 15: registro original de PPP de 5 seg. em papilar isolado eletricamente estimulado do GC. $[Ca^{2+}] = 2$ mM. Note o período de pausa de 5 seg após a seta.

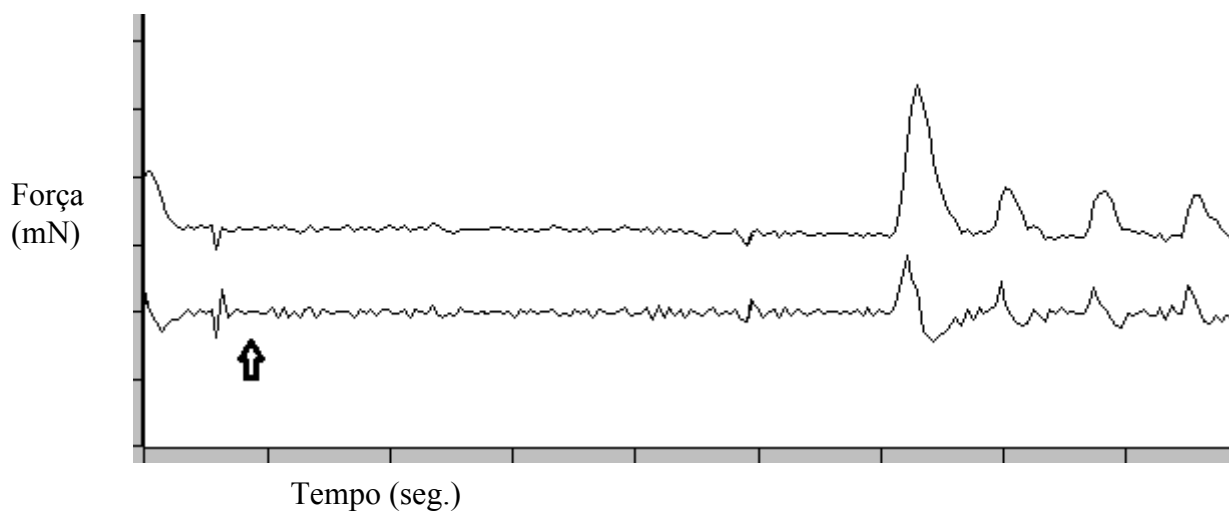
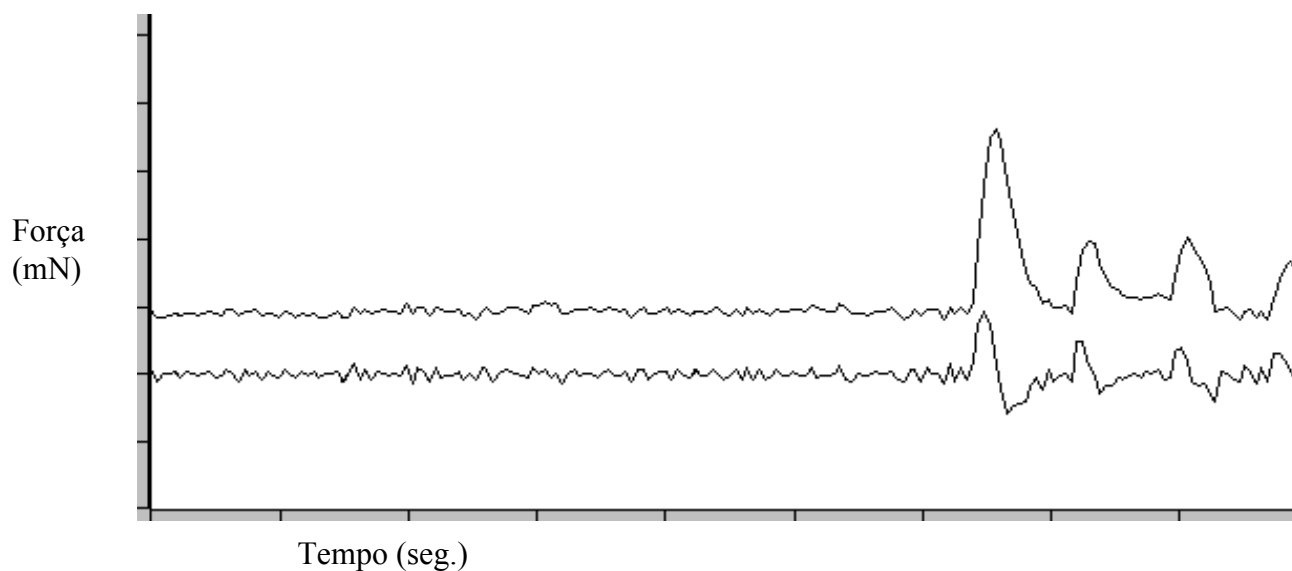
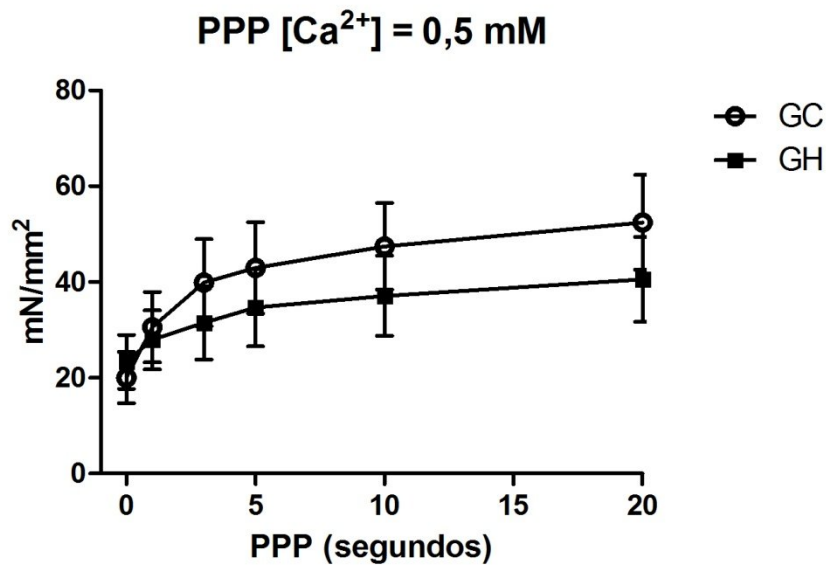


Fig. 16: registro original de PPP de 10 seg. em papilar eletricamente estimulado do GC. $[Ca^{2+}] = 2$ mM. Note a PPP obtida após pausa de 10 seg. (mostrada já em período de pausa).



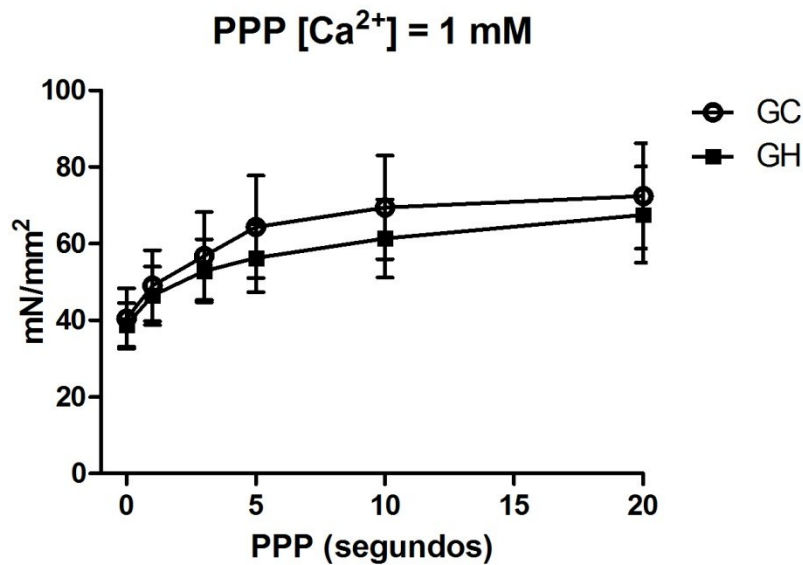
Nota: Registros obtidos através do programa labtech.

Gráfico 1: Potenciação pós – pausa de músculos papilares isolados de animais do grupo controle e hipertireoideo. $[Ca^{2+}]_e = 0,5$ mM.



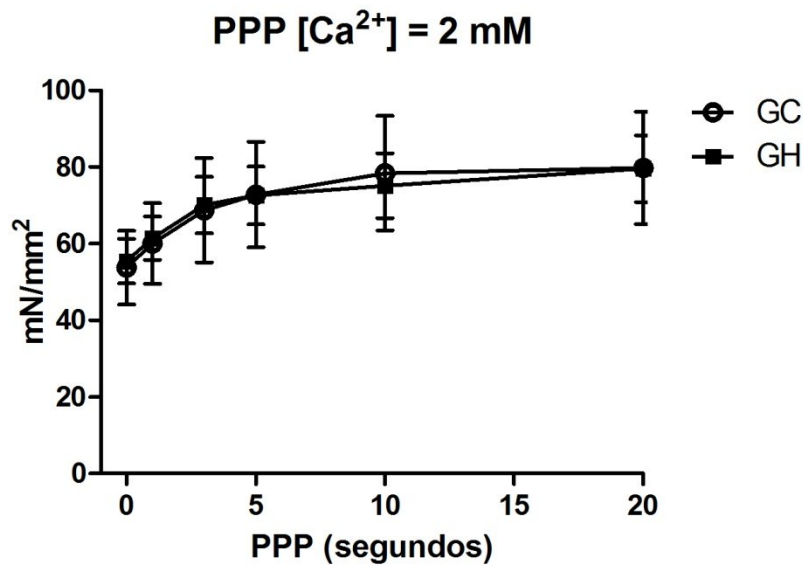
Nota: Animais do grupo controle (n=8) e hipertireoideos (n=8) à 0,5 mM de Ca^{2+} extracelular. Tempo 0: Pico de força absoluta; PPP: 1, 3, 5, 10 e 20 segundos. $P > 0,05$.

Gráfico 2: Potenciação pós – pausa de músculos papilares isolados de animais do grupo controle e hipertireoideo. $[Ca^{2+}]_e = 1$ mM.



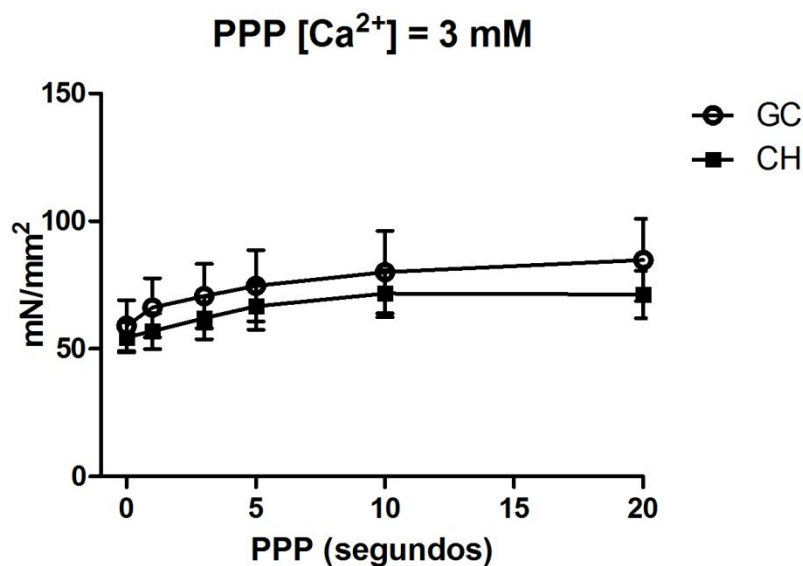
Nota: Animais do grupo controle (n=8) e hipertireoideos (n=8) à 1 mM de Ca^{2+} extracelular. Tempo 0: Pico de força absoluta; PPP: 1, 3, 5, 10 e 20 segundos. $P > 0,05$.

Gráfico 3: Potenciação pós – pausa de músculos papilares isolados de animais do grupo controle e hipertireoideo. $[Ca^{2+}]_e = 2$ mM.



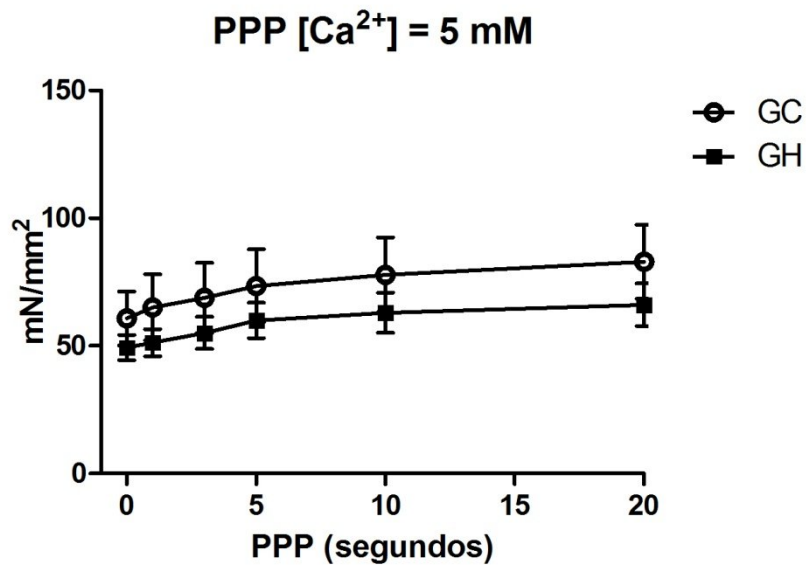
Nota: Animais do grupo controle (n=8) e hipertireoideos (n=8) à 2 mM de Ca^{2+} extracelular. Tempo 0: Pico de força absoluta; PPP: 1, 3, 5, 10 e 20 segundos. $P > 0,05$.

Gráfico 4: Potenciação pós – pausa de músculos papilares isolados de animais do grupo controle e hipertireoideo. $[Ca^{2+}]_e = 3$ mM.



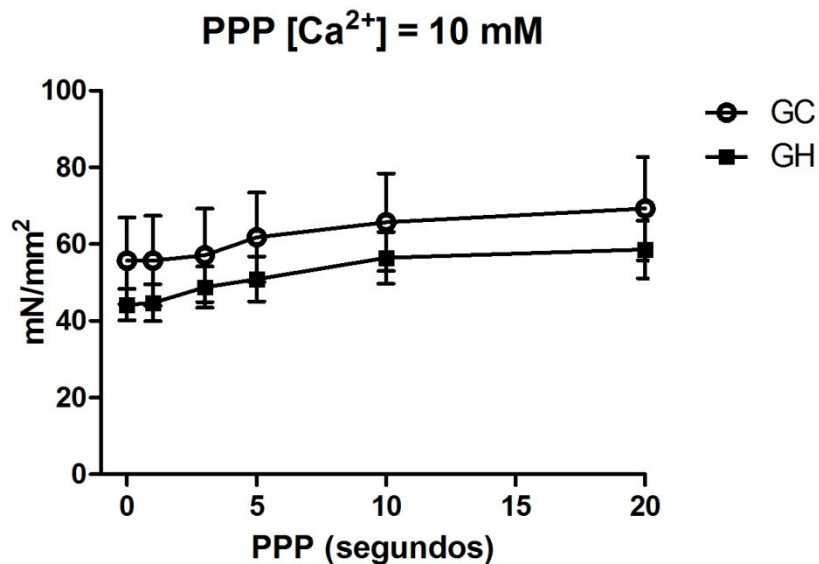
Nota: Animais do grupo controle (n=8) e hipertireoideos (n=8) à 3 mM de Ca^{2+} extracelular. Tempo 0: Pico de força absoluta; PPP: 1, 3, 5, 10 e 20 segundos. $P > 0,05$.

Gráfico 5: Potenciação pós – pausa de músculos papilares isolados de animais do grupo controle e hipertireoideo. $[Ca^{2+}]_e = 5$ mM.



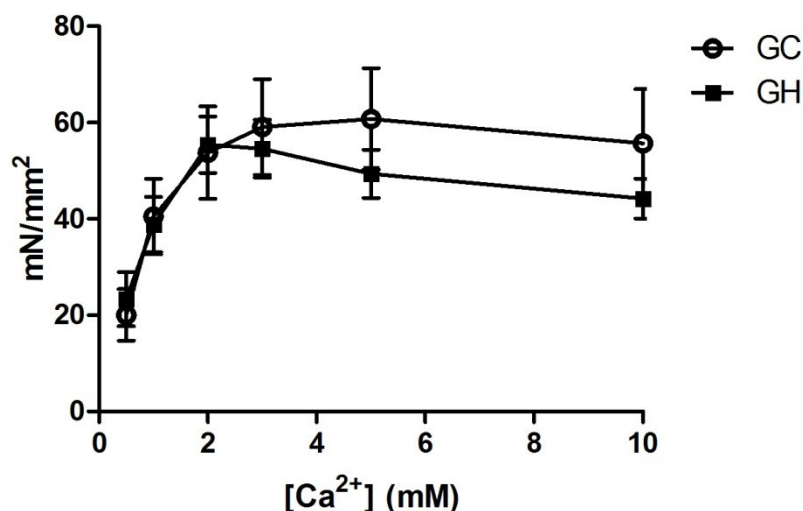
Nota: Animais do grupo controle (n=8) e hipertireoideos (n=8) à 5 mM de Ca^{2+} extracelular. Tempo 0: Pico de força absoluta; PPP: 1, 3, 5, 10 e 20 segundos. $P > 0,05$.

Gráfico 6: Potenciação pós – pausa de músculos papilares isolados de animais do grupo controle e hipertireoideo. $[Ca^{2+}]_e = 10$ mM.



Nota: Animais do grupo controle (n=8) e hipertireoideos (n=8) à 10 mM de Ca^{2+} extracelular. Tempo 0: Pico de força absoluta; PPP: 1, 3, 5, 10 e 20 segundos. $P > 0,05$.

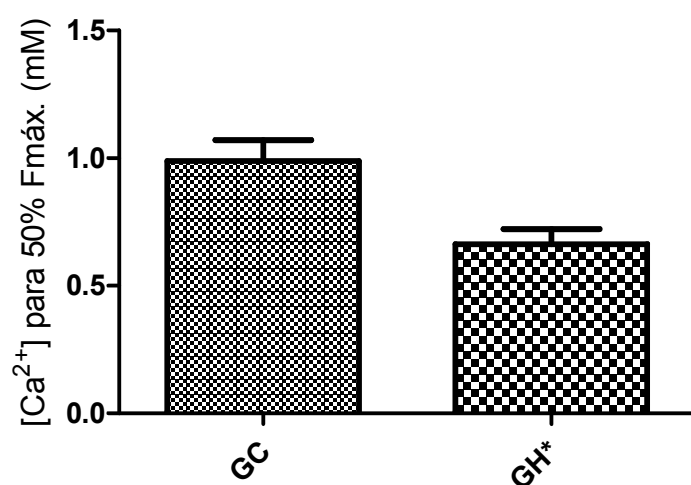
Gráfico 7: Força de contração (mN/mm²) de animais do grupo controle e hipertireoideo.



Nota: Animais do grupo controle (n=8) e hipertireoideos (n=8) na concentração extracelular de cálcio de 0,5, 1, 2, 3, 5, e 10 mM.

No entanto, a concentração de cálcio extracelular necessária para produzir 50% da força máxima foi estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$), como mostrado no gráfico 8. A concentração (mM) no GC foi de $0,85 \pm 0,25$ e no GH foi de $0,6 \pm 0,2$.

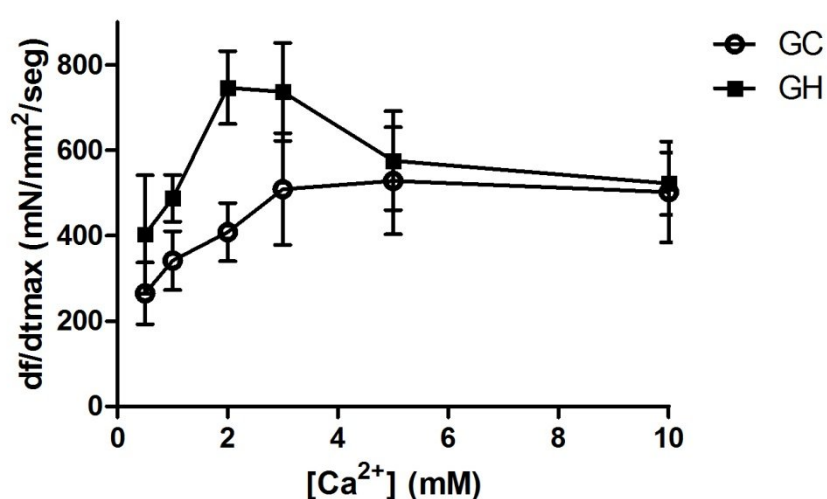
Gráfico 8: Concentração de Cálcio (Ca²⁺) extracelular necessária para produzir 50% da Força máxima (Fmáx.) em músculos papilares isolados do grupo controle e hipertireoideo.



NOTA: Animais do grupo controle (n=8) e hipertireoideos (n=8). Os valores estão mostrados como média \pm SE. * $P < 0,05$ comparado aos animais do grupo controle.

Como mostrado no gráfico 9, a velocidade máxima de desenvolvimento de força durante a contração (df / dt_{max}), que indica a velocidade de contração dos músculos papilares, não foi diferente entre os grupos ($p > 0,05$), exceto para a concentração de 2 mM de cálcio extracelular ($p \leq 0,05$).

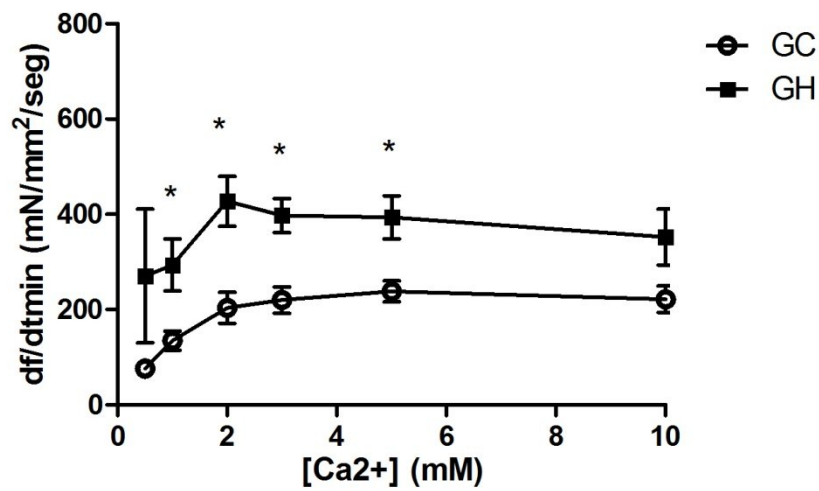
Gráfico 9: Velocidade máxima de desenvolvimento de força durante a contração (df / dt_{max}) em músculos papilares isolados do grupo controle e hipertireoideo.



NOTA: Animais do grupo controle (n=8) e hipertireoideos (n=8). [Ca²⁺] em mM: 0,5, 1, 2, 3, 5 e 10.

No entanto, como mostrado no gráfico 10, a velocidade máxima de diminuição da força durante o relaxamento (df / dt_{min}), que indica a velocidade do relaxamento dos músculos papilares, foi estatisticamente maior em todas as concentrações de cálcio extracelular, exceto 0,5 e 10 mM ($p \leq 0,05$).

Gráfico 10: Velocidade máxima de diminuição de força durante o relaxamento (df / dtmin) em músculos papilares isolados do grupo controle e hipertireoideo.



NOTA: Animais do grupo controle (n=8) e hipertireoideos (n=8). [Ca²⁺] em mM: 0,5, 1, 2, 3, 5 e 10.

6 DISCUSSÃO

Muitos estudos têm demonstrado a interação entre HT e o sistema cardiovascular (OJAMAA, *et al* 1993; OJAMAA, *et al.*, 1996; TSATSOULIS, *et al.*, 2000; KLEIN & OJAMAA, 2001; FAZIO, *et al.*, 2004; KAHALY & DILLMANN, 2005; RAMOS, *et al* 2006; KLEIN & DANZI, 2007; OWEN *et al.*, 2007). No entanto, após a leitura de muitos artigos científicos, podemos afirmar que este é o primeiro estudo a demonstrar as consequências do hipertireoidismo no coração, pressão arterial e glândulas supra - renais através de uma avaliação abrangente do rendimento cardíaco "*in vivo*" e "*in vitro*", utilizando um modelo animal, o que nos permite analisar fisiologicamente os efeitos diretos dos hormônios tireoideos (hipótese do miocárdio - contratilidade) e os efeitos hemodinâmicos (hipótese vascular – lei de Frank - Starling).

Existem três principais mecanismos envolvidos na regulação do débito cardíaco: o mecanismo que ajusta de momento a momento o débito cardíaco, representado pela lei de Frank – Starling (mecanismo heterométrico), o mecanismo de regulação da contratilidade miocárdica que opera graças às flutuações nos níveis intracelulares de cálcio, e ocorre a cada ciclo cardíaco; e a sensibilização do sistema de regulação do complexo troponina tropomiosina, presente nos filamentos finos (MOHRMAN E HELLER, 2007). O mecanismo de regulação heterométrico é dependente do volume diastólico final e, portanto, depende do retorno venoso e do volume de líquido no compartimento vascular. O mecanismo de regulação da contratilidade miocárdica opera sempre que fatores neuro-humorais, como a concentração de catecolaminas circulantes entre outros venham a modificar a condutância dos canais de cálcio presentes no sarcolema, dos trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, da bomba de cálcio, da atividade da SERCA e da sensibilidade do sistema contrátil ao cálcio. Além destes três mecanismos de regulação do débito cardíaco, a regulação da frequência cardíaca, possibilita

que o débito cardíaco seja ajustado às diferentes condições de vida do indivíduo (CINGOLANI E HOUSSAY, 2004; MOHRMAN E HELLER, 2007). Dessa forma, nós combinamos diferentes abordagens para mostrar que tanto o tamanho do coração quanto o processo de acoplamento excitação - contração de (AEC) são alterados em ratos com hipertireoidismo por ações sobre os mecanismos de regulação do débito cardíaco.

Já foi mostrado previamente que o hipertireoidismo induz hipertrofia cardíaca concêntrica e intolerância ao exercício devido à redução da reserva cardíaca e, á longo prazo, resulta em insuficiência cardíaca (BROWN, FENNING, *et al.*, 2002; DORR, WOLFF *et al.*, 2005; HU, *et al.*, 2005). Dados clínicos indicam que existe uma associação forte entre a função tireoidiana, a massa cardíaca e a hipertrofia ventricular esquerda em sujeitos com idade entre 45 e 79 anos (DORR *et al.*, 2005). De maneira similar, o hipertireoidismo subclínico (concntração sérica de TSH diminuída, embora as concentrações de T3 e T4 sejam normais) também é associado com hipertrofia cardíaca concêntrica (DI BELLO *et al.*, 2007). No entanto, Dorr *et al.*, 2005, em seu estudo clínico investigou o impacto do hipertireoidismo e do hipertireoidismo subclínico no músculo cardíaco e não encontrou associação entre hipertireoidismo subclínico e hipertrofia ventricular esquerda, o que não descarta a possibilidade de existir esta associação, já que, como notado pelos próprios autores, os indivíduos participantes do estudo deveriam representar um estágio inicial de hipertireoidismo subclínico, pois se houvesse qualquer desordem da tireoide já conhecida, o indivíduo era excluído da pesquisa. Por outro lado, Taillard, *et al.*, 2011, embora não tenham encontrado alterações morfológicas ventriculares, detectaram disfunção diastólica do ventrículo esquerdo, em pacientes em terapia supressora de TSH. Dessa forma, considerando – se que mesmo o hipertireoidismo subclínico pode alterar o funcionamento cardíaco, o hipertireoidismo, através de mudanças importantes na estrutura e funcionamento cardíacos, pode acarretar insuficiência cardíaca e falência cardíaca.

Diferente do que se poderia esperar por uma hipertrofia considerada fisiológica, muitos estudos também mostram alterações histológicas como desorganização dos discos intercalares, além de frequência cardíaca elevada em repouso e diminuição da eficiência cardíaca no hipertireoidismo (DORR, WOLFF *et al* 2005; HU *et al.*, 2005). A taquicardia em repouso e suas implicações são a principal causa para a insuficiência cardíaca encontrada no hipertireoidismo (OJAMAA, 2010; DILLMANN, 2010). A FC pode ser alterada por modificação direta das propriedades elétricas das células de automaticidade intrínseca (nodo sinusal), ou alterações nos níveis de fatores neuro-humorais que modulam a atividade das células do nodo sinusal (BIONDI, *et al* 2004). Apesar de o efeito cronotrópico positivo exercido pelo T3 estar bem caracterizado, as bases moleculares de suas ações não estão totalmente claras. Alterações específicas na expressão ou função de canais iônicos devido ao hipertireoidismo têm sido mostradas. Dois genes responsáveis pela codificação de canais para a corrente hiperpolarizante I_f , a qual contribui para a automaticidade foram clonados e chamados HCN2 e HCN4. O HCN2 produz canais responsáveis pelo componente rápido da corrente I_f e o HCN4 codifica para canais responsáveis pelo componente lento (GLOSS, *et al* 2001). A I_f se ativa por hiperpolarização e portanto, questiona-se o papel desta no nodo sinusal. Por outro lado, a $I_{Ca,T}$ parece ser a principal em nodo sinusal, já que está ativa na faixa de voltagem de cerca de -60 mV (LE BOUTER, *et al* 2003, MANGONI, *et al* 2008, PURTELL, *et al* 2010). No entanto, a análise dos dados de eletrocardiografia não demonstrou alterações elétricas importantes no grupo hipertireoideo. Ainda assim, em concordância com os estudos citados, a FC apresentou – se significativamente aumentada.

Em nosso estudo, a massa cardíaca aumentou grandemente, indicando desenvolvimento de hipertrofia como mostrado pelo aumento do peso do coração / peso corporal (mg/g). Além disso, o aumento do coração e as alterações no seu funcionamento são mostrados pela ecocardiografia e experimentos com músculo papilar isolado. Nossos dados

mostraram aumento da FC, FE, DC (*in vivo*), df/dt_{min} e uma maior sensibilidade à concentração de cálcio extracelular (*in vitro*). Da mesma forma, mostraram uma diminuição no VDF, VSF, TRIV, TDT, TE, VA e relação E/A (*in vivo*), o que indicam efeito inotrópico (força de contração), cronotrópico (frequência cardíaca) e lusitrópico (velocidade de relaxamento) positivos. A diminuição do TE e do TRIV, assim como do df/dt_{min} , observados no GH pode ser explicada pelo aumento da velocidade de recaptação de Ca^{2+} pelo RS e/ou diminuição dos níveis de fosfolambano, o que caracteriza ação direta no mecanismo contrátil que regula o DC.

Estes dados também podem explicar a intolerância ao exercício (KLEIN & DANZI, 2007) dos indivíduos com hipertireoidismo devido à incapacidade de aumentar os parâmetros contráteis ainda mais como é exigido pelo exercício, demonstrando que os corações podem estar operando próximo de sua capacidade máxima, assim como pode justificar a maior incidência de arritmias devido à taquicardia e, em longo prazo, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca.

A força de contração máxima, bem como a df/dt_{max} (*in vitro*) não alcançaram diferença estatística. Este achado pode sugerir que o coração no hipertireoidismo não é capaz de desenvolver uma contração máxima mais forte durante a sístole do que um coração normal. Por outro lado, a causa para a força de contração máxima não alterada pode ser a diminuição do TE, o que se traduz em menor tempo para alcançar a força máxima. Esta constatação está de acordo com a não alteração de DS nem de TCIV (*in vivo*). No entanto, como a sensibilidade ao cálcio extracelular é maior (*in vitro*), a mesma concentração de cálcio produz uma maior contração sub-máxima, o que explica a FE aumentada (*in vitro*). Estes achados estão em concordância com estudos de função cardíaca no hipertireoidismo (OJAMAA, *et al* 1993; OJAMAA, *et al.*, 1996; TSATSOULIS, *et al.*, 2000; KLEIN & OJAMAA, 2001; TAKEUCHI, *et al.*, 2003; FAZIO, *et al.*, 2004; DORR, *et al.*, 2005; RAMOS, *et al* 2006;

KLEIN & DANZI, 2007; OWEN *et al.*, 2007; JIANG, *et al.*, 2006; PURTELL *et al.*, 2010) e mostram fortemente que o coração hipertireoideo, mesmo quando em situações de repouso, tem seu funcionamento contrátil alterado. Em nosso estudo combinamos experimentos “*in vivo*” e “*in vitro*” para comprovar que a alteração na função cardíaca se mantém em ambas as situações. No entanto, o índice de Tei, que é amplamente usado para detectar tanto disfunção sistólica quanto diastólica, não foi estatisticamente diferente. Embora este achado possa parecer contraditório, isso somente ocorreu porque no grupo hipertireoideo, o TE diminuiu proporcionalmente ao TRIV.

Um fator importante que poderia limitar a correlação entre os dados dos experimentos “*in vivo*” e “*in vitro*” é o regime anestésico que foi empregado (SCHAEFER, *et al.* 2005). Como o exame ecocardiográfico de ratos e camundongos só pode ser realizado com animais anestesiados, o regime anestésico utilizado poderia influenciar negativamente na correlação dos resultados. Além disso, em preparações isoladas as velocidades de contração e relaxamento são calculadas em função do tempo e da força produzida, o que não foi realizado na avaliação ecocardiográfica. Entretanto, ainda que este fato deva ser considerado, foi possível encontrar correlações concretas entre estes dois tipos de experimentos.

A potenciação pós – pausa de 1, 3, 5, 10 e 20 segundos, que pode indicar a velocidade de recaptção de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático pela SERCA2, não foi diferente entre os animais do grupo controle e do grupo hipertireoideo. Este fato pode refletir um tempo de repouso suficiente para a recaptção de cálcio para o retículo sarcoplasmático em ambos os grupos. Thomal, 2007, em animais hipotireoideos, utilizando períodos de pausa de 15, 45 e 60 segundos, também não encontrou alteração na PPP. A ausência de alteração das PPP do grupo hipertireoideo comparado com o grupo controle pode ser explicada por uma possível diminuição da expressão do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ nos animais com hipertireoidismo. De fato, Reed *et al.*, (2000) mostram que a expressão de SERCA2a e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ estão

aumentados e diminuídos respectivamente, no hipertireoidismo em camundongos. Dessa forma, uma menor quantidade de íons cálcio é transportada para fora das células, mantendo uma concentração citosólica deste íon suficiente para produzir uma potenciação pós-pausa semelhante a dos eutireoideos. Portanto, dez dias de injeções de T3, embora tenha sido suficiente para demonstrar amplas alterações cardiovasculares no hipertireoidismo, não mostrou alterações na PPP nestes animais nos intervalos de tempo mensurados, seja por efeitos sobre a SERCA, seja por efeitos sobre o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

De acordo com Gay *et al.*, (1988), a complacência venosa é aumentada no hipertireoidismo, portanto, a pré-carga está aumentada. Na verdade, em condições fisiológicas (magnitude, raio, espessura da parede e comprimento do ventrículo esquerdo) a pré-carga pode ser determinada pelo VDF e, portanto, podemos concluir a partir de dados de nossa ecocardiografia que mostra VDF diminuído que a pré-carga está diminuída no grupo hipertireoideo. No entanto, devido à hipertrofia concêntrica, Biondi & Klein (2002) mostraram que a FC alta encontrada no hipertireoidismo deve induzir diminuição do VDF se a pré-carga não está aumentada, portanto, o VDF deve ser corrigido para o peso do corpo, a fim de alcançar um índice de pré-carga mais confiável, devido ao fato de que os animais com hipertireoidismo perdem peso. Desta forma, nossos resultados mostram que não há diferença no VDF/ peso corporal entre o grupo controle e o grupo hipertireoideo, sugerindo fortemente que a pré-carga não está aumentada em animais com hipertireoidismo. Além disso, embora o DS não seja diferente no grupo hipertireoideo, o que pode ser compreendido pelo VDF diminuído, assim como pelo VSF diminuído, a FE está aumentada, proporcionando uma evidência de efeito direto dos hormônios tireoideos no aumento da contratilidade cardíaca. Além disso, o efeito cronotrópico positivo dos hormônios tireoidianos (ou seja, FC alta) garante o maior DC encontrada no grupo hipertireoideo, apesar de o DS não estar aumentado.

Em relação à pressão arterial, em nosso estudo, de acordo com estudos em humanos (IGLESIAS *et al.* 2005), o PAS foi maior no grupo hipertireoideo e a PAD não foi afetada pelo tratamento com T3. Este achado sugere aumento da contratilidade do coração de ratos com hipertireoidismo, como confirmado pela maior FE mesmo havendo diminuição do VDF e do VSF, ao invés de alteração na RVPT, já que alterações da RVPT, na ausência de alteração na complacência (distensibilidade) arterial, acarretariam aumentos proporcionais na PAS e na PAD. Por outro lado, alguns estudos mostram diminuição da RVPT causada pelo hipertireoidismo (DIEKMAN *et al.*, 2001B; AXELBAND F *et al.*, 2011). Considerando – se que nosso estudo não encontrou diferença significativa na RVPT entre os grupos, o aumento da PAS poderia ser resultado de aumento da contratilidade do coração de ratos com hipertireoidismo devido á ação direta dos HT sobre o coração, levando a aumento de força de contração e de FC.

Nossos achados sugerem efeitos funcionais que estão em concordância com os efeitos encontrados por outros estudos biológicos sobre as ações diretas dos hormônios tireoidianos em termos de expressão e atividade de canais iônicos relacionados ao AEC cardíaco, ou seja, expressão aumentada de DHPR, RyR, SERCA2a, α - MHC, actina, troponina I, Na^+ / K^+ ATPase e canais de K^+ dependentes de voltagem e redução da expressão de fosfolambano, β - MHC e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ como descrito anteriormente (OJAMAA, *et al.*, 1993; BRENT, 1994; REED *et al.*, 2000; BOUTER, *et al.*, 2003; KAHALY & DILLMANN, 2005; JIANG, *et al.*, 2006; PURTELL *et al.*, 2010).

A ativação do eixo hipotálamo hipófise – supra – renal tem sido associada com hipertireoidismo (JOHNSON *et al.*, 2005). O aumento na atividade do eixo hipotálamo hipófise – supra – renal é seguido, dentro de poucos minutos, por níveis aumentados de corticosterona (o principal glicocorticóide em ratos). No entanto, poucos estudos investigaram se existe uma relação direta entre disfunções tireoidianas e funcionamento da glândula supra –

renal. Os estudos existentes baseiam - se em mensurações da concentração plasmática basal de ACTH e corticosterona, as quais encontram - se elevadas na tireotoxicose (TSATSOULIS *et al.*, 2000; KAMILARIS *et al.*, 1991; HARVARD *et al.*, 1970).

De acordo com Bamberg *et al*, 2001, a concentração de glicocorticóides no sangue não é um indicador apropriado de um evento estressante, porque é influenciado pela situação momentânea que desencadeia o estresse. De fato, em estudos experimentais, amostras sanguíneas provocam aumento da concentração de corticosterona caso não seja realizada dentro de dois minutos desde o momento em que o animal foi manipulado pela primeira vez. Em ratos, manipular e retirar amostras de sangue são eventos altamente estressantes, portanto, interferem com as concentrações de glicocorticóides (TOUMA *et al*, 2003). Em contraste, amostras de fezes permitem o monitoramento das concentrações de corticosterona sem que se corra o risco de estressar o animal. Dessa forma, a coleta de fezes para mensurações de glicocorticóides fecais, é uma técnica não – invasiva para estudar o impacto de diferentes tratamentos na atividade supra – renal.

Em nosso estudo, medimos a concentração de corticosterona fecal no primeiro, quinto e décimo dia de tratamento com T3, já que, como dito anteriormente, 15% a 25% da corticosterona é excretada nas fezes. Desta forma, eliminamos o componente estresse que acompanha as mensurações plasmáticas das concentrações de corticosterona. Os níveis de corticosterona fecal foram maiores no grupo hipertireoideo no quinto dia, embora esta diferença não tenha sido mantida no décimo dia de tratamento. Excluimos a possibilidade de maior níveis fecais de corticosterona encontrada no grupo hipertireoideo ser devido a uma resposta inicial ao estresse devido as injeções seguida de adaptação a esse estímulo, porque o grupo controle também recebeu injeções de veículo. De outra forma, este achado mostra que, inicialmente, o hipertireoidismo aumenta a velocidade metabólica do córtex supra-renal, porém, esta alteração não é mantida quando a retroalimentação negativa de glicocorticóides e

ACTH está intacto (PECORI *et al.*, 2010). Este achado está de acordo com a relação peso da supra-renal / peso corporal não alterada e sugere fortemente que os efeitos do hipertireoidismo são independentes da ativação do eixo hipotálamo – hipófise – supra - renal pelos hormônios tireoidianos.

7 CONCLUSÃO

Nosso estudo mostra que o hipertireoidismo promove efeitos inotrópicos, cronotrópicos e lusitrópicos positivos no coração por ações diretas de T3 e aumenta a PAS. Estas alterações não estão correlacionadas com alterações na concentração fecal de corticosterona.

REFERÊNCIAS

- ALMERS, W.; ADRIAN, R. H.; LEVINSON, S. R. Some Dielectric Properties of Muscle Membrane and Their Possible Importance for Excitation-Contraction Coupling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.264, p.278-292, 1975.
- ANDREWS, M. A. W.; MAUGHAN, D. W.; NOSEK, T. M.; GODT, R. E. Ion-Specific and General Ionic Effects on Contraction of Skinned Fast-Twitch Skeletal-Muscle from the Rabbit. **Journal of General Physiology**, v.98, p.1105-1125, 1991.
- ANJOS-RAMOS, L.; CARNEIRO-RAMOS, M.S.; DINIZ, G.P.; MARTINS-SILVA J; BARRETO-CHAVES, M.L.; Early cardiac hypertrophy induced by thyroxine is accompanied by an increase in VEGF-A expression but not by an increase in capillary density. **Virchows Archiv**, v.448, p.472-479, 2006.
- AXELBAND, F., DIAS J., FERRÃO F.M., EINICKER LAMAS M.; Nongenomic signaling pathways triggered by thyroid hormones and their metabolite 3-iodothyronamine on the cardiovascular system. **J. Cell Physiol.** v.226(1):21-8. 2011.
- BACHMAN, E. S.; HAMPTON, T. G.; DHILLON, H., AMENDE, I.; WANG, J. F.; MORGAN, J. P.; HOLLENBERG, A. N. The metabolic and cardiovascular effects of hyperthyroidism are largely independent of beta-adrenergic stimulation. **Endocrinology**, v.145, p. 2767-2774, 2004.
- BAHOUTH, S. W.; CUI, X. L.; BEAUCHAMP, M. J.; SHIMOMURA, H.; GEORGE, S. T.; PARK, E. A. Promoter analysis of the rat beta(1)-adrenergic receptor gene identifies sequences involved in basal expression. **Molecular Pharmacology**, v.51, p.620-629, 1997.
- BAHOUTH, S. W.; GARDNER LA, HAJJHUSSEIN H. Rab11a and its binding partners regulate the recycling of the β 1-adrenergic receptor. **Cell Signal**, v.23(1):46-57, 2011.
- BERS, D. M.; STIFFEL, V. M. Ratio of Ryanodine to Dihydropyridine Receptors in Cardiac and Skeletal-Muscle and Implications for E-C Coupling 4. **American Journal of Physiology**, v.264, p.1587-1589, 1993.
- BERS, D. M. BERS, DONALD M. **Excitation Contraction Coupling and Cardiac Contraction Force**. 1.ed. Kluwer Academic Publishers, 2001.
- BIONDI, B.; KLEIN, I. Hypothyroidism as a risk factor for cardiovascular disease. **Endocrine**, v.24, p.1-13, 2004.
- BRENT, G. A. The Molecular-Basis of Thyroid-Hormone Action. **Journal of Medicine**, v.33, p. 847-853, 1994.
- BRIX, K.; FÜHRER, D.; BIEBERMANN, H. Molecules important for thyroid hormone synthesis and action-known facts and future perspectives. **Thyroid Res**, c. 4, Suppl 1:S9, 2011

BROWN L.; FENNING, A.; CHAN, V.; LOCH, D.; WILSON, K.; ANDERSON, B.; BURSTOW, D. Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats. **Heart Lung and Circulation**, v.11, p.167-73, 2002.

BROWN, L.; FENNING, A.; CHAN, V.; LOCH, D.; WILSON, K.; ANDERSON B.; BURSTOW, D. Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats. **Heart, Lung and Circulation**, v.11, p. 167-173, 2002.

CARVALHO-BIANCO, S. D.; KIM, B. W.; ZHANG, J. X.; HARNEY, J. W.; RIBEIRO, R. S.; GERESEN, B.; BIANCO, A. C.; MENDE, U.; LARSEN, P. R. Chronic cardiac-specific thyrotoxicosis increases myocardial beta-adrenergic responsiveness. **Molecular Endocrinology**, v.18, p.1840-1849, 2004.

CAO X, KAMBE F, MIYAZAKI T, SARKAR D, OHMORI S AND SEO H. Novel human ZAKI-4 isoforms: hormonal and tissue-specific regulation and function as calcineurin inhibitors. *Biochem J* 367: 459-466, 2002.

CHAUDHRI, B.; DEL MONTE, F.; HAJJAR, R. J.; HARDING, S. E. Interaction between increased SERCA2 a activity and beta-adrenoceptor stimulation in adult rabbit myocytes. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 283, p.2450-2457, 2002.

CHENG, S.Y.; LEONARD, J.L.; DAVIS, P.J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. **Endocr Rev**, v. 31 (2), p. 139-170. Epub, 2010

CINGOLANI HE, HOUSSAY AB. Fisiologia humana de Houssay. 7. ed., atual. e ampl. Porto Alegre: Artmed, 2004.

COSTANZO LS. Fisiologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

DAVIA, K.; BERNOBICH, E.; RANU, H. K.; DEL MONTE, F.; TERRACCIANO, C. M. N.; MACLEOD, K. T.; ADAMSON, D. L.; CHAUDHRI, B.; HAJJAR, R. J.; HARDING, S. E. SERCA 2a overexpression decreases the incidence of aftercontractions in adult rabbit ventricular myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.33, p.1005-1015, 2001.

DI, BELLO, V.; AGHINI-LOMBARDI, F.; MONZANI, F.; TALINI, E.; ANTONANGELI, L.; PALAGI, C.; DI CORI, A.; CARACCIO, N.; DELLE DONNE, M.G.; DARDANO A.; PINCHERA, A.; MARIANI, M. Early abnormalities of left ventricular myocardial characteristics associated with subclinical hyperthyroidism. **Journal of Edocrinological Investigation**, v.30, p.564-571, 2007.

DIEKMAN, M. J. M.; DOULABI, B. Z.; SCHIPHORST, M. P. T.; FLIERS, E.; BAKKER, O.; WIERSINGA, W. M. a. The biological relevance of thyroid hormone receptors in immortalized human umbilical vein endothelial cells. **Journal of Endocrinology**, v.168, p.427-433, 2001.

DIEKMAN, M. J. M.; HARMS, M. P. M.; ENDERT, E.; WIELING, W.; WIERSINGA, W. M. b. Endocrine factors related to changes in total peripheral vascular resistance after

treatment of thyrotoxic and hypothyroid patients. **European Journal of Endocrinology**, v.144, p. 339-346. 2001.

DILLMANN, W. Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling. **Heart Failure Reviews**, v.15, p.125-32, 2010.

DORR, M.; WOLFF, B.; ROBINSON, D. M.; JOHN, U.; LUDEMANN, J.; MENG, W., FELIX, S. B., & VOLZKE, H. The association of thyroid function with cardiac mass and left ventricular hypertrophy. **Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v.90, .p. 673-677. 2005.

FAZIO, S.; PALMIERI, E.A.; LOMBARDI, G.; BIONDI, B. Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 59, p.31-50, 2004.

FERON, O.; BALLIGAND, J. L. Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart . **Cardiovascular Research**, v.69, p. 788-797, 2006.

FLAMANT, F.; GAUTHIER, K.; SAMARUT, J. Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. **Molecular Endocrinology**, v.21, p.321-333, 2007.

FLEISCHER, S.; INUI, M.; NAGASAKI, K.; CHADWICK, C.; SAITO, A. Membrane Regulation of Muscle-Contraction and Relaxation in Fast Twitch Skeletal-Muscle. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.82, p.147-148, 1988.

FORREST, D.; VENNSTROM, B. Functions of thyroid hormone receptors in mice. **Thyroid**, v.10, p. 41-52. 2000.

FRAICHARD, A.; CHASSANDE, O.; PLATEROTI, M.; ROUX, J. P.; TROUILLAS, J.; DEHAY, C.; LEGRAND, C.; GAUTHIER, K.; KEDINGER, M.; MALAVAL, L.; ROUSSET, B.; SAMARUT, J. The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. **Embo Journal**, v.16, p.4412-4420, 1997.

GAUTHIER, K.; CHASSANDE, O.; PLATEROTI, M.; ROUX, J. P.; LEGRAND, C.; PAIN, B.; ROUSSET, B., WEISS, R.; TROUILLAS, J.; SAMARUT, J. Different functions for the thyroid hormone receptors TR alpha and TR beta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. **Embo Journal**, v.18, p.623-631. 1999.

GAY, R.G.; RAYA, T.E; LANCASTER, L.D.; LEE, R.W.; MORKIN, E.; GOLDMAN, S. Effects of thyroid state on venous compliance and left ventricular performance in rats. **American Journal of Physiology**, v. 254, p.81-88, 1988.

GLOSS, B.; TROST, S. U.; BLUHM, W. F.; SWANSON, E. A.; CLARK, R.; WINKFEIN, R.; JANZEN, K. M.; GILES, W.; CHASSANDE, O.; SAMARUT, J.; DILLMANN, W. H. Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta. **Endocrinology**, v.142, p.544-550, 2001.

GODT, R. E.; FOGACA, R. T. H.; SILVA, I. K.; NOSEK, T. M. Contraction of Developing Avian Heart-Muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology**, v.105, p. 213-218, 1993.

GOUMAZ, M. O.; SCHWARTZ, H.; OPPENHEIMER, J. H.; MARIASH, C. N. Kinetic-Model of the Response Os Precursor and Mature Rat Hepatic Messenger-Rna-S14 to Thyroid-Hormone. **American Journal of Physiology**, v.266, p.1001-1011, 1994.

GREENSPAN, F. S. The thyroid gland. In: Greenspan, F.; Strewler, G. J **Basic & Clinical Endocrinology**. London: Appleton & Lange. 2003. p. 192-262.

HARVARD, C.W.H; SALDANHA, V.F.; BIRD, R.; GARDNER, R. Adrenal function in hyperthyroidism. **British Medical Journal**, v.1, p.337-339,1970.

HOIT, B. D.; KHOURY, S. F.; SHAO, Y. F.; GABEL, M., LIGGETT, S. B.; WALSH, R. A. Effects of thyroid hormone on cardiac beta-adrenergic responsiveness in conscious baboons. **Circulation**, v.96, p.592-598. 1997.

IGLESIAS, P.; ACOSTA, M.; SÁNCHEZ, R.; FERNÁNDEZ-REYES, M.J.; MON C; DíEZ, J.J. Ambulatory blood pressure monitoring in patients with hyperthyroidism before and after control of thyroid function. **Clinical Endocrinology**, v.3, p.66-72, 2005.

JIANG, M.; XU, A.; NARAYANAN, N. Thyroid hormone downregulates the expression and function of sarcoplasmic reticulum-associated CaM kinase II in the rabbit heart. **American Journal Physiology Heart and Circulation Physiology**, v.29, p.1384-1394, 2006.

JOHANSSON, C.; VENNSTROM, B.; THOREN, P. Evidence that decreased heart rate in thyroid hormone receptor-alpha 1-deficient mice is an intrinsic defect. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.44, p.640-646, 1998.

JOHNSON, E.O.; KAMILARIS, T.C.; CALOGERO, A.E.; GOLD, P.W.; CHROUSOS, G.P. Experimentally-induced hyperthyroidism is associated with activation of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **European Journal of Endocrinology**, v.153: p.177-185 2005.

KAHALY, G. J.; DILLMANN, W. H. Thyroid hormone action in the heart. **Endocrine Reviews**, v.26, p.704-728, 2005.

KAMILARIS, T.C.; DEBOLD, C.R.; JOHNSON, E.O.; MAMALAKI, E.; LISTWAK, S.J.; CALOGERO, A.E.; KALOGERAS, K.T.; GOLD, P.W.; ORTH, D.N. Effects of short and long duration hypothyroidism and hyperthyroidism on the plasma adrenocorticotropin and corticosterone responses to ovine corticotropin-releasing hormone in rats. **Endocrinology**, v.128 p.2567-2576, 1991.

KITAZAWA, T.; GAYLINN, B. D.; DENNEY, G. H.; SOMLYO, A. P. G-Protein-Mediated Ca²⁺ Sensitization of Smooth-Muscle Contraction Through Myosin Light Chain Phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.1708-1715, 1991.

KLEIN, I.; DANZI, S. Thyroid disease and the heart. **Circulation**, p.116, v.1725-1735, 2007.

KLEIN, I.; OJAMAA, K. a. Thyroid hormone and the cardiovascular system. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 501-509. 2001.

KLEIN, I.; OJAMAA, K. b. Thyroid hormone-targeting the heart. **Endocrinology**, v.142, p. 11-12, 2001.

LE BOUTER, S.; DEMOLOMBE, S.; CHAMBELLAN, A.; BELLOCQ, C.; AIMOND, F.; TOUMANIANTZ, G.; LANDE, G.; SIAVOSHIAN, S.; BARÓ, I.; POND, A.L.; NERBONNE, J.M.; LÉGER, J.J.; ESCANDE, D.; CHARPENTIER, F. Microarray analysis reveals complex remodeling of cardiac ion channel expression with altered thyroid status: relation to cellular and integrated electrophysiology. **Circulation Research**, v.92, p.234-242, 2003.

LEHRER, P.; GENERELLI, P.; HOCHRON, S. The effect of facial and trapezius muscle tension on respiratory impedance in asthma. **Applied Psychophysiology and Biofeedback**, v. 22, p. 43-54, 1997.

LEWARTOWSKI, B.; WOLSKA, B. M. The Effect of Thapsigargin on Sarcoplasmic-Reticulum Ca^{2+} Content and Contractions in Single Myocytes of Guinea-Pig. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.25, p. 23-29, 1993.

LI, M.; LI. M. HU; J. CHEN; Z.; MENG, J.; WANG,H.; MA, X.; LUO, X. Evidence for histamine as a neurotransmitter in the cardiac sympathetic nervous system. **American Journal of Physiology Heart and Circulation Physiology**, v.291, p.45-51, 2006.

LIN, H. Y.; DAVIS, F. B.; GORDINIER, J. K.; MARTINO, L. J.; DAVIS, P. J. Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.276, p.1014-1024, 1999.

LIN, S.; PERL, A. K. T.; SHANNON, J. M. Erm/thyroid transcription factor 1 interactions modulate surfactant protein C transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, p.16716-16726, 2006.

MANGONI ME AND NARGEOT J. Genesis and regulation of the heart automaticity. **Physiol Rev** 88: 919-982, 2008.

MARTINEZ, O. R. V. I.; MARTINEZ, O. R.; VILLANUEVA I. Depletion and recovery of catecholamines in several organs of rats treated with reserpine. **Autonomic Neuroscience**,v.128, p.64-69, 2004.

MILLIGAN, R. A.; FLICKER, P. F. Structural Relationships of Actin, Myosin, and Tropomyosin Revealed by Cryoelectron Microscopy 1. **Journal of Cell Biology**, v.105, p. 29-39, 1987.

MOHRMAN DE, HELLER LJ. Fisiologia cardiovascular. São Paulo: Mc Graw Hill. 6.ed, 2007.

NOSEK, T. M., LEALCARDOSO, J. H., MCLAUGHLIN, M., & GODT, R. E. Inhibitory Influence of Phosphate and Arsenate on Contraction of Skinned Skeletal and Cardiac-Muscle 1. **American Journal of Physiology**, v.259, p.933-939, 1990.

OJAMAA, K. Signaling mechanisms in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. **Vascular Pharmacology**, v. 52, p.113-119, 2010.

OJAMAA, K.; KLEIN, I. In vivo regulation of recombinant cardiac myosin heavy chain gene expression by thyroid hormone. **Endocrinology**, v.132, p.1002-1006, 1993.

OJAMAA, K., BALKMAN, C.; KLEIN, I. L. Acute Effects of Triiodothyronine on Arterial Smooth-Muscle Cells. **Annals of Thoracic Surgery**, v.56, p.61-67, 1993.

OWEN, P.J.; SABIT, R.; LAZARUS, J.H. Thyroid disease and vascular function. **Thyroid**, v.17, p.519-24, 2007.

PARK, K. W.; DAI, H. B.; OJAMAA, K.; LOWENSTEIN, E.; KLEIN, I.; SELLKE, F. W. a The direct vasomotor effect of thyroid hormones on rat skeletal muscle resistance arteries. **Anesthesia and Analgesia**, v.85, p.734-738, 1997.

PARK, K. W.; DAI, H. B.; OJAMAA, K.; LOWENSTEIN, E.; KLEIN, I.; SELLKE, F. W. b. Thyroid hormones dilate skeletal muscle resistance arteries in rats. **Anesthesia and Analgesia**, v.84, p.117. 1997.

PECORI, G.F.; PESCE, S.; MARONI, P.; PAGLIARDINI, L.; LASIO, G.; LOSA, M.; CAVAGNINI, F. Inhibitory effect of prepro-thyrotrophin-releasing hormone on adrenocorticotrophic hormone secretion by human corticotroph tumours. **Journal of Neuroendocrinol**, v.22, p.294-300, 2010.

PERLINI *et al.* Sympathectomy or doxasin, but not propranolol, bunt myocardial interstitial fibrosis in pressure-overload hypertrophy. **Hypertension**, v.46:1213-8, 2005.

PERLINI *et al.* Survival benefits of different antiadrenergic interventions in pressure overload left ventricular hypertrophy/failure. **Hypertension**, v.48:93-7, 2006.

PRABHAKAR, R.; BOIVIN, G. P.; GRUPP, I. L.; HOIT, B.; ARTEAGA, G.; SOLARO, R. J.; WIECZOREK, D. F. A familial hypertrophic cardiomyopathy alpha-tropomyosin mutation causes severe cardiac hypertrophy and death in mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.33, p.1815-1828, 2001.

PURTELL, K.; ROEPKE, T.K.; ABBOTT, G.W. Cardiac arrhythmia and thyroid dysfunction: a novel genetic link. **The Internation Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.42, p.1767-1770, 2010.

RATGE, D.; BARTHEL, U.; WISSER, H.; BODE, J. C. Side-Effects and Changes in Plasma Norepinephrine and Epinephrine Levels After Intravenous-Injection of Thyroliberin in Subjects with Normal and Abnormal Thyroid-Function. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.25, p.393-400, 1987.

REED, T.D.; BABU, G.J.; J, I.Y.; ZILBERMAN, A.; VER HEYEN, M.; WUYTACK F; PERIASAMY, M. The expression of SR calcium transport ATPase and the Na(+)/Ca(2+) Exchanger are antithetically regulated during mouse cardiac development and in Hypo/hyperthyroidism. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 32 p.453-64, 2000.

REDWOOD, C. S.; MOOLMAN-SMOOK, J. C.; WATKINS, H. Properties of mutant contractile proteins that cause hypertrophic cardiomyopathy 1. **Cardiovascular Research**, v.44, p.20-36, 1999.

RYBIN, V. O.; GUO, J. F.; SABRI, A.; ELOUARDIGHI, H.; SCHAEFER, E.; STEINBERG, S. F. Stimulus-specific differences in protein kinase C delta localization and activation mechanisms in cardiomyocytes 1. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.19350-19361, 2004.

TSATSOULIS, A; JOHNSON, E.O.; KALOGERA, C.H.; SEFERIADIS, K.; TSOLAS, O. The effect of thyrotoxicosis on adrenocortical reserve. European. **Journal of Endocrinology**, v. 42, p. 231–235, 2000SAHIN, I.; TURAN, N.; KOSAR, F.; TASKAPAN, C.; GUNEN, H. Evaluation of autonomic activity in patients with subclinical hypothyroidism. **Journal of Endocrinological Investigation**, v.28, p.209-213, 2005.

SCHAEFER A, MEYER GP, BRAND B, HILFIKER-KLEINER D, DREXLER H, KLEIN G. Effects of Anesthesia on Diastolic Function in Mice Assessed by Echocardiography. **Echocardiography**, v. 22:665-670, 2005.

SCRIVEN, D. R. L.; DAN, P.; MOORE, E. D. W. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. **Biophysical Journal**, v.79, p.2682-2691, 2000.

SEGAL, J. Action of the Thyroid-Hormone at the Level of the Plasma-Membrane. **Endocrine Research**, v.15, p. 619-649, 1989.

SEGAL, J. Calcium Is the 1St Messenger for the Action of Thyroid-Hormone at the Level of the Plasma-Membrane - 1St Evidence for An Acute Effect of Thyroid-Hormone on Calcium-Uptake in the Heart. **Endocrinology**, v.126, p.2693-2702, 1990.

SILVA, I. K., FOGACA, R. T. H., & GODT, R. E. Effects of Inorganic-Phosphate (Pi), Orthovanadate (Vi), and 2,3 Butanedione Monoxime (Bdm) on Contraction of Triton Skinned Fibers from Rabbit and Lobster Muscle. **Biophysical Journal**, v.64, p.363-. 1993.

SONG, M.; ZHU, N.; OLCESSE, R.; BARILA, B.; TORO, L.; STEFANI, E. Hormonal control of protein expression and mRNA levels of the MaxiK channel alpha subunit in myometrium. **Febs Letters**, v.460, p. 427-432, 1999.

SPERELAKIS, N.; KATSUBE, Y.; YOKOSHIKI, H.; SADA, H.; SUMII, K. Regulation of the slow Ca⁺⁺ channels of myocardial cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.164, p.85-98, 1996.

SPERELAKIS, N.; XIONG, Z. L.; HADDAD, G.; MASUDA, H. Regulation of Slow Calcium Channels of Myocardial-Cells and Vascular Smooth-Muscle Cells by Cyclic-Nucleotides and Phosphorylation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.140, p.103-117, 1994.

STILES, G. L.; LEFKOWITZ, R. J. Thyroid-Hormone Modulation of Agonist - Beta-Adrenergic-Receptor Interactions in the Rat-Heart. **Life Sciences**, v. 28, p.2529-2536, 1981.

SUGIYAMA, A.; TAKEHANA, S.; KIMURA, R.; HASHIMOTO, K.. Negative chronotropic and inotropic effects of class I antiarrhythmic drugs assessed in isolated canine blood-perfused sinoatrial node and papillary muscle preparations. **Heart and Vessels**, v.14, p.96-103, 1999.

TAILLARD V, SARDINOUX M., OUDOT C., FESTER P., RUGALE C., RAINGEARD I; Early detection of isolated left ventricular diastolic dysfunction in high-risk differentiated thyroid carcinoma patients on tsh-suppressive therapy. **Clin Endocrinol**, v.75:709-14,2011.

TAKEUCHI, K.; MINAKAWA, M.; OTAKI, M.; ODAGIRI, S.; ITOH, K.; MURAKAMI, A.; YAKU, H.; KITAMURA, N. Hyperthyroidism causes mechanical insufficiency of myocardium with possibly increased SR Ca²⁺-ATPase activity. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 53, p.411-416, 2003.

TEI C, NISHIMURA RA, SEWARD JB AND TAJIK AJ. Noninvasive Doppler-derived myocardial performance index: Correlation with simultaneous measurements of cardiac catheterization measurements. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v.10, p.169-178, 1997.

THOMAL RA. Avaliação da função cardíaca em modelo experimental de hipotireoidismo. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em saúde da criança e do adolescente – UFPR, 2007.

TOUMA, C., SACHSER N., MOSTI E., PALME R.; Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. **Gen Comp Endocrinol**, v.130, p.267-78.

WANG, Y.Y.; JIAO, B.; GUO, W.G.; CHE, H.L.; YU, Z.B. Excessive thyroxine enhances susceptibility to apoptosis and decreases contractility of cardiomyocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.14, p. 67-75, 2010.

WAGENKNECHT, T.; RADERMACHER, M. 3-Dimensional Architecture of the Skeletal-Muscle Ryanodine Receptor. **Febs Letters**, v.369, p.43-46, 1995.

WAGENKNECHT, T.; RADERMACHER, M. Ryanodine receptors: Structure and macromolecular interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, v.7, p.258-265,1997.

WAGENKNECHT, T.; SAMSO, M. Three-dimensional reconstruction of ryanodine receptors 4. **Frontiers in Bioscience**, v.7, p.1464-1474, 2002.

WIBO, M.; BRAVO, G.; GODFRAIND, T. Postnatal Maturation of Excitation Contraction Coupling in Rat Ventricle in Relation to the Subcellular-Localization and Surface-Density of 1,4- Dihydropyridine and Ryanodine Receptors. **Circulation Research**, v.68, p. 662-673, 1991.

WIKSTROM, L.; JOHANSSON, C.; SALTO, C.; BARLOW, C.; BARROS, A. C.; BAAS, F.; FORREST, D., THOREN, P.; VENNSTROM, B. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1 2. **Embo Journal**, v.17, p.455-461, 1998.

WOLSKA, B. M., KELLER, R. S., EVANS, C. C., PALMITER, K. A., MUTUCHAMY, M., WIECZOREK, D. F., DE TOMBE, P. P., & SOLARO, R. J. Correlation between myofilament response to $\text{Ca}^{(2+)}$ and altered dynamics of contraction and relaxation in transgenic cardiac cells expressing beta-tropomyosin **Circulation Research**, v.84, p.745–751, 1999.

WYATT HL, HENG MK, MEERBAUM S. Cross-sectional echocardiography. II Analysis of mathematic models for quantifying volume of the famalin-fixed left ventricle. **Circulation**, v.61, p.1119-1126, 1980.

YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiological Reviews**, v.81, p.1097-1142, 2001.